

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.**
- 2.***** shows the word which can not be translated.**
- 3.In the drawings, any words are not translated.**

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Target affinity polypeptide [the technical field of invention]

This invention relates to the construction of a new polypeptide which improved or improved the avidity or the singularity over hapten and an antigen, application, and manufacture.

This invention relates to the activity of these molecules again at construction of the antibody's recombinant molecule guided from the manifestation of a surface presentation antigen component library or a hapten joint component library, amelioration and sorting, and a list.

The polypeptide of this invention has the usefulness in the diagnosis in pharmaceuticals industry and the healthcare industry, a therapy, preliminary diagnosis, or the field of prevention, and it has the usefulness in a general application rather than it can set to detection and analysis of a chemical at a list.

[Background of the Invention]

An antibody is a protein molecule with the binding affinity to a target antigen or hapten. An antibody is used as a diagnostic drug and a reagent for a therapy by the singularity of an affinity interaction. A monoclonal antibody is guided from pure cell lineage like a hybridoma cell. However, costs of a hybridoma technique are high, and maintenance takes time amount, and the range is limited. It is impossible to produce a monoclonal antibody (very little antibody with suitable compatibility) to the antigen of all range. An antibody gene or its fragmentation can be made to discover with the gestalt which can clone and functions biologically within Escherichia coli (E. coli).

An antibody and an antibody fragment can be manufactured again by the recombinant DNA technique which used any of a bacteria cell or a mammals cell they were. In the Fab field of an antibody, six adjustable surface loop formations are given at the head of a molecule with the combination of two heavy chains and a light chain. The loop formation which exists in these

external domains (Fv) is called a complementarity determining region (CDRs), and gives the antibody joint singularity over the target antigen. Localization of this binding action is carried out to the adjustable domain of an antibody molecule, and this domain is located in the amino terminus of both a heavy chain and a light chain. This is shown in drawing 1 . Even after the variable region in some antibodies is cut from an original antibody molecule by protein hydrolysis, it remains in the condition (a VHVL dimer and Fv field are called) of having met in noncovalent bond, and holds most of the antigen recognition ability and binding affinities. The method of manufacturing the double strand Fv in which a constant region does not exist substantially is indicated by U.S. Pat. No. 4,642,334.

It is easy to dissociate a recombination Fv fragment. Therefore, that researcher etc. did covalent bond of how many domains [two], and it chose forming the structure called scFv. In this scFv, two peptides (usually the heavy chain variable region and light chain variable region of an antibody) which have a joint domain are combined with the linker peptide which connects the C terminal of one domain to the amino terminal of another side so that the relative location of an antigen joint domain may be in agreement with the physical relationship seen by the original antibody (refer to drawing 1). The manufacture approach of Fv fragment combined with United States patent 4,946,778th and 5,132,405 in covalent bond is indicated. Furthermore, different-species mixing (heterogeneity) is attained by manufacture of a bifunctional reagent (bifunctional agents) and a polyfunctional reagent (multifunctional agents) (U.S. Pat. No. 4,816,397 by U.S. Pat. No. 5,091,513, RANDA, etc., such as Houston).

Construction of a scFv library is indicated by the Europe patent application No. 239400 and U.S. Pat. No. 4,946,778. However, a single-stranded Fv library receives a limit in magnitude for the problem which is inherent in cloning of the single DNA molecule in which scFv ** carries out a code. A non-scFv library like VH or a Fab library is also well-known, and a **** (Ladner and GutermanWO 90/02809) and this are used with the phage system for a surface manifestation (Ladner et al., W088/06630 and Bonnert et al, WO 92/01047). Since it will trigger an antigenic reaction if Homo sapiens is medicated with a monoclonal antibody (usually mouse origin) when using it for an antibody therapy, an activity is restricted unless "hominization" is carried out probably. The adjustable domain of an antibody consists of a framework of beta sheet structure which has six hypervariable regions (CDRs) which form an antigen binding site. Hominization consists of permuting the array, especially CDR loop-formation array of the mouse which gives binding affinity in Homo sapiens adjustable domain structure. Therefore, the CDR loop-formation field of this mouse gives the binding affinity to a desired antigen. The hominization of the recombination antibody by transplantation of CDRs is indicated by Winter et al

(EP-239400).

It is Marks et al and J.Mol.Biol.1991 to make various recombination Homo sapiens antibodies discover using a manifestation / combination system. It is indicated by 222,581-597. The latest new data (McCafferty et al, Nature 1991 348 552; Clackson et al, J.Mol.Biol., 1991 352 624-28) in the approach of making a peptide and protein discovering on the surface of filamentous phage offer the capacity which chooses and improves these reagents as a diagnosis and a cure, and is developed. Using the bacteriophage genome by which it was improved for performing the cloned heavy chain which has the origin in both a mouse and Homo sapiens and light chain gene expression, presentation, and involution is indicated by Hoogenboom et al.Nucl.Acids.Res. and 19 4133-4137;Marks et al.1991 op.cit. and Bonnert et al, and WPI Acc.No.92-056862/07.

An acceptor molecule (the manifestation is the result of the gene library which carries out a code discovering this acceptor in a manifestation organism) may also be expressed by the same approach (Lerner and Scorge, WO 90/14430). It is indicated by Ladner et al WO/06630 about the manifestation by the cell surface of the single-stranded antibody domain united with cell surface protein.

Maturation of compatibility is the process in which the joint singularity, compatibility, or avidity of an antibody is changed. Various experiment techniques are devised and various amino acid sequences are created by applying various mutation strategies for any of the field chosen [CDRs / the whole antibody fragment or] being. The mutation to which the specific activity of an enzyme is changed is also reported. This contractor will learn the various approaches for choosing the molecule with which the request was embellished at the list in order to attain random mutation or part directivity mutation. By performing the re-combination of an one chain type (for example, heavy chain) library about the so-called "chain shuffling (chain shuffling)" technique (for example, light chain), i.e., the fixed complementary chain About the device which raises versatility and chooses a specific antibody Kang et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA and 1991 88 4363-466; -- Hoogenboom et al, Nucl.Acid Res., and 1991 19 4133-4137; It is indicated by Marks et al, Bio/Technology, and 1992 10 779-783.

In order to conquer the problem to which Homo sapiens reacts to V domain of an antibody, a framework, or the mouse array of which part of a constant region, a recombination Homo sapiens antibody gene library can be built from the various human tissues containing a peripheral blood lymphocyte (Winter and Milstein Nature, 1991 349 293). Since the Homo sapiens adult has already received the antigenic stimulus, an adult B cell ensemble's capacity by which immunization was carried out beforehand to recognize a wide range antigen is reflected in the ensemble who decrease in number as compared with a B cell

ensemble by birth and by whom the mRNA molecule of an antibody was restricted.

Therefore, one of the organizations chosen in order to obtain the largest possible antigen binding capacity is embryo peripheral blood, and it is **. This extermination peripheral blood is still the condition of having been born, and the ratio of an IgM antibody molecule is higher than grown-up blood (about 70%; in addition IgG 30%). Therefore, the supply source of ideal gene stock for building the antibody library which planned extensive maturation (evolution) so that various antigens could be combined variously is offered.

[Summary of the Invention]

Therefore, the following matter is included within the limits of this invention.

- 1) Identification and construction of a new recombination polypeptide which are combined to a target.
- 2) Change such a polypeptide agent according to the device which contains the mutation of the DNA coding region, for example, and change the engine performance.
- 3) Furthermore, with the re-combination of a subcomponent, it sets they to be [any of gene level or protein level], and change these polypeptide agents. if the first side face is followed -- this invention -- a target affinity polypeptide -- it is -- a -- stable core polypeptide field (SCR) b -- at least one target joint field (TBR)

** is provided. Said target joint field provides arbitration with the polypeptide which has passed through the mature process, in order to change the singularity, compatibility, or avidity to a target.

We were able to design and build the polypeptide by this invention by which the singularity, compatibility, or avidity of association was changed, without needing operation of a mature process. surpassing -- for example, it was carried out using an immunoglobulin (Ig) and CD8.

We indicate the construction of the target affinity polypeptide of monovalence in which TBR is carrying out covalent bond to SCR. These SCRs are two Ig Mr. domains (for example, an antibody variant part domain or CD8 domain) as for which Ig super family carried out covalent bond preferably.

It is formed of *****.

We show how the target affinity polypeptide of many organic functions may be manufactured by forming on SCR TBRs which dissociated or overlapped again. We also showed that Ig Mr. domain of the member of Ig super family could be built as SCRs, and it joined together in noncovalent bond, and the target affinity polypeptide of two functionality and polyfunctional nature could be manufactured. We indicate how the amino acid sequence which forms the stable dimer which can carry out covalent bond to Ig Mr. domain, carries out a self-association by that cause, and has two functionality or polyfunctional singularity preferably, an aggregate, or an array is designed. A target affinity

field can be combined with a target molecule, and the chemical of which type is sufficient as this target molecule. For example, the member of everything [target / this] but an antigen; antibody or Ig super families, such as hormone, such as small molecules, such as an insecticide or a drug, and a steroid, amino acid, a peptide or polypeptide; bacterial, viral, or a cell surface antigen; they may be a tumor marker, a growth factor, etc. This contractor could choose the target of various objects variously easily.

When the polypeptide of this invention is used for the diagnostic object in the Inn vitro, if a core polypeptide field is suitable protein, it is good anything. However, when meaning carrying out the Inn BIBO activity of the polypeptide of this invention, as for this core polypeptide field, it is desirable that it is nonantigenic. Therefore, probably, all are suitable if it is the usual Homo sapiens protein of the type which is generally tolerant which exists in a blood serum or appears in cell surface. The fixed domain of the usual cell surface protein is produced with a meltable mold, and can improve or change the compatibility by the approach of this invention. In the case of the Homo sapiens protein which makes T cell surface protein an original target, the fusibility fragmentation becomes a promising immune control therapy agent useful to especially transplantation. Probably, much of these fragmentation has homology with the protein of the super family of an immunoglobulin.

the especially desirable voice of this invention -- it sets like and a target is chosen from the group which consists of the cell surface protein: tumor growth factor alpha (TGF-alpha) and leukemia inhibitor (LIF) of a viral antigen; tumor marker, CD28, and CD4 grades, such as glycoporphin (glycoporphin) or other erythrocyte cell surface proteins, an influenza virus neuraminidase; hepatitis B antigen, and gp40 protein of HIV. Also in application [which / of a diagnosis and a therapy], especially if the target joint field has two or more singularity, it is useful. a target joint polypeptide -- compatibility with two or more targets -- **** -- especially the thing to be is desirable. It dissociates, or this compatibility overlaps a front face, and is offered by forming two functionality or a polyfunctional reagent. The reagent of 2 operation nature or the sex for prolificacy also uses a linker-polypeptide for arbitration, and is considered to be creation **** covalent bond or by carrying out a noncovalent bond in each target affinity polypeptide.

In the second side face, this invention offers the DNA structure which carries out the code of the above-mentioned target affinity polypeptide.

It is the approach of manufacturing the DNA structure with which this invention carries out the code of the target affinity polypeptide of this invention in the third side face, and one or more cycles which consist of mutation and sortings are presented with DNA which carries out the code of the target affinity polypeptide, and the approach possessing obtaining the sub ensemble of the DNA molecule which carries out the code of the target affinity

polypeptide by which the description of compatibility, singularity, or avidity was changed is offered.

Preferably, as for DNA which carries out the code of the target affinity polypeptide, it is desirable to exist in an element with duplicate capacity or an expression vector (display vector), i.e., the vector which carries out self-renewal in a suitable host. This expression vector is chosen from the group which consists of fibrous bacteriophages, such as a bacteriophage and Fd, a virus, bacteria, yeast, slime mold, or a mammals animal cell preferably. mutagenesis -- random or a part -- you may be directional any, and this contractor will learn many methods of having been suitable in order to perform this process, and will come out. Mutation is presented with one or more target joint fields of a target affinity polypeptide.

By the desirable mutation system used for this invention, the special mutant of the Escherichia coli which was named mutD and mutT1 and which was carried out is used (R. Fowler et al, J.Bacteriol., 1986 167:130). These special mutants can transfect in phage and are useful for especially the object of this invention. In a desirable mode, the approach of manufacturing the above-mentioned target affinity polypeptide a -- DNA which carries out the code of the framework structure of the target affinity polypeptide of one or more requests with the process isolated by the polymerase chain reaction In order to induce mutation to one or more target joint fields of b target affinity polypeptide Process which presents arbitration with this DNA at mutagenesis The process which inserts c this DNA in one or more expression vectors, The process which sorts out the sub ensemble of the expression vector expressing a target affinity polypeptide with the singularity, avidity, or compatibility of d request, This [e] in order to obtain the sub ensemble of the expression vector expressing the target affinity polypeptide by which the description of compatibility, singularity, or avidity was changed in the sub ensemble sorted out Process with which one or more cycles which consist of mutagenesis and sortings are presented The process which inserts in a high-level expression vector DNA which carries out the code of the target affinity polypeptide of which f alteration was done is provided.

the conventional method of versatility [selection / of the sub ensemble of an expression vector], such as utilization of target association, fluorescence activation cell sorting, biotin avidin, or a biotin SUTOREPUTOABIJINSHI system, -- it is attained. Especially a desirable approach is compatibility selection performed on insoluble base materials, such as an immunity tube. It turned out that especially this is simple.

Therefore, also offering the approach of manufacturing a target affinity polypeptide will be understood by this invention's importing the advanced expression vector of the above-mentioned publication into a suitable manifestation host again, making a target joint polypeptide discover, and

isolating the protein produced in this way.

Moreover, a target affinity field and a stable core polypeptide may be fields where the same molecules differ, or it will be understood clearly that you may be guided from a different molecule.

Combination with other molecules (the domain here of the MHC class I and II molecule etc.) relevant to the changed antibody or an antibody fragment, scFv fragmentation including the meeting link which makes combination possible when continuous, alteration CD8 molecule (for example, single-stranded [CD / 8]) and an antibody molecule or its fragmentation, CD8, or an immunoglobulin super family is included in the type of a target affinity polypeptide structure in which an idea is carried out by this invention. For example, IalphaMHC class 3 domain is combined with CD8, therefore the fusibility version of alpha 3 becomes a leading immunity modifier. The following are contained in the desirable structure using CD8.

- a) The single-stranded molecule with which only V Mr. domain of alpha and beta subunit is connected.
- b) The molecule which changed N-terminal amino acid into the serine from the lysine in order to enable a manifestation with bacteria, without changing the charge balance of transit peptide and having an adverse effect on biological activity.

A target affinity polypeptide can contain the polypeptide tail which carried out covalent bond, and this tail may be TBRs or may be meeting in noncovalent bond with other TBRs(es).

Although especially the following publications have mentioned some examples about an IgG type antibody and its fragmentation, it will be understood clearly that this invention can be applied also to the antibody of other types (IgM, IgA, etc.).

The DNA array which carries out the code of the target affinity polypeptide can clone this polypeptide to any vector which can be expressed to bacteria phage or cell surface. desirable ** KUTA -- pHFA -- it is -- the structure -- the [international patent application] -- it is indicated by PCT/AU 93/00228, and gets down, and the structure is shown in drawing 4 . Bacteria hosts desirable to the manifestation of protein are Escherichia coli (E. coli) and Bacillus subcillus (Bacillus subtilis).

[Detailed explanation of a drawing]

This invention is explained to a detail with reference to the following examples and drawings which are not restrictive.

Drawing 1 has illustrated the structure of an antibody and its fragmentation.

- (a) This consists of the two same heavy chains and the two same light chains, and shows the polypeptide chain structure of a typical IgG antibody in which each of a heavy chain and a light chain is divided into the adjustable domain (V) and the stationary domain (C). The whole IgG molecule has the two same

antigen joint front faces at the end of Fv field, and a these antigens joint front face is formed of the involution of VH chain and VL chain. With this combination of VH and VL, six loop formations called a complementarity determining region (CDRs) are offered at the head of a molecule, and these loop formations give the joint singularity of the antibody to that target antigen by offering an antigen joint front face.

(b) The Fab antibody fragment contains a part of one light chain and one heavy chain.

(c) Both Fab fragment and each of Fv fragment are considered to have the same antigen joint front face as a parent antibody.

covalent-bond-fusion of as opposed to [in drawing 2] the secondary coat protein (gene III protein) at this head of phage to the front face of a fibrous Fd bacteriophage -- or an antibody fragment like the Fab molecule expressed as fusion in main gene VIII coat proteins and a scFv molecule is shown. Support only of one chain (a heavy chain or light chain) is carried out to the coat protein of phage, and the chain of another side is given in the form of fusibility into the periplasm of a host cell by the meltable form about the expression of a Fab molecule. Although the infectivity to a host cell is falling by fusion on gene III protein, this Fd bacteriophage is still viable.

The approach by which the pool (library) of a heavy chain field and a light chain variable region unites one chain with the gene III protein or gene VIII protein of phage, and drawing 3 is built in Fd phage expression vector is shown. This expression vector is transfected into a host cell, and generates a duplex combination library. The gene which each host cell manufactures viable Fd phage as which an antibody fragment is expressed by the phage front face, and carries out the code of the antibody is packed with a viral genome. Affinity purification of phage is based on the compatibility over a target antigen, and enables simultaneous recovery from the survival phage of the gene which carries out the code of the antibody. Although a FAJIMIDO expression vector can improve transformation yield, the helper phage for assembling a viable descendant is needed. Although construction of a hierarchical library is included in another strategy, a chain is expressed with the library of the second chain and the highest involution chain of compatibility is sorted out for while it was maintained uniformly here. A more complicated library can be built using the gene pool on another expression vector, and, subsequently to a host cell, crossover transfection of this library is carried out. It will depend for recovery of a gene on the relative packing effectiveness of these two vectors. Drawing 4 shows the structure of the FAJIMIDO vector HFA. While this vector has the capacity which discovers the cloning antibody united with the gene III protein of Fd phage front face in the control stock of Escherichia coli (E. coli), in a non-controlling stock, this cloning antibody gene is discovered as a fusibility product. A lacZ promoter enables induction of the manifestation by

IPTG, and FLAG (it is discovered as fusant with an antibody) is used for composite detection and affinity purification.

Drawing 5 shows the theoretical minimum distance (angstrom) connected with a series of scFV-NC10 deficit linker structures by the polypeptide linker.

Drawing 6 shows the DNA array of the synthetic oligonucleotide duplex chain which was inserted into pPOW-scFV-NC10 by which limit decomposition was carried out appropriately and which carries out the code of the polypeptide linker from which the length differs.

Drawing 7 shows analysis of scFV-NC10 protein compounded from VH, 15 and VL, VH, 10, VL-VH, 5 and VL, and VH-VL. The photograph of drawing The analysis result of the unguided mold (lanes 1-4) on KUMASHIGERU (upper panel), and an induction type (lanes 5-8), A probe is carried out by anti-FLAG and M2 antibody (IBI, New Haven, CT). Then, it is as a result of [of the western blotting of this KUMASHIGERU that was processed with the goat anti-mouse antibody and horseradish peroxase complex as the second antibody (sigma company), and was further detected by enhancement chemiluminescence (Amersham)] analysis (a lane 9 - 16 lower panels).

Drawing 8 is the degree of association of observed scFV-NC10, and the epitome of activity to the target antigen.

Drawing 9 shows the identity of the structure between an antibody Fv fragment and CD8 alpha-chain heterodimer.

(a) This is ribbon drawing of VH or VL molecule in which the CDR loop formation which attached the number of 1-6, and the framework region (ribbon) saved structurally are shown.

(b) This is ribbon drawing of two CD8 alpha chains. The field corresponding to an antibody CDR loop formation is shown in the crowning of a molecule, and the number is attached.

Orientation of this gay dimer is carried out to space with the molecule opposite shaft which carries out a vertical position. The CVR Mr. loop formation from the top face of a molecule is shown, about one subunit, the number of 1, 2, and 3 is given to a CDR1 Mr. loop formation, a CDR2 Mr. loop formation, and a CDR3 Mr. loop formation, respectively, and the number of 1', 2', and 3' is given to them about the subunit of another side, respectively. The C terminal has extended from the pars basilaris ossis occipitalis of a molecule. The loop formations which form a dimer interface are a CDR3 Mr. loop formation (crowning) and a C-C'loop formation (pars basilaris ossis occipitalis).

Drawing 10 shows the SDS-PAGE gel dyed by Coomassie which shows all the cytoid monsters of scCD8 compounded in the Escherichia coli host cell pop2136 using pPOW. The arrow head shows the location of fusion and maturation (signal sequence which cleft) scCD8. In this drawing Unguided cell containing rain 1:pPOW-scCD8 After [4 hours] incubation of rain 2:pPOW-scCD8 Unguided cell containing rain 3:pPOW-Lys->Ser-scCD8 4 of

rain 4:pPOW-Lys->Ser-scCD8 After [time amount] incubation It is the molecular weight marker dyed before rain 5:.

Drawing 11 shows the scheme by which affinity maturation of each antibody gene may be carried out. Each gene is sorted out from a phage expression library, and, subsequently receives the Inn BIBO mutation or the Inn vitro mutation of a number round. Subsequently the antibody fragment which carried out affinity maturation is sorted out about the capacity combined with an antigen in advance of the further mutation round or high-level gene expression. The whole antibody library can increase whenever [compound] by repeating a mutation round in advance of sorting of each phage by panning or affinity sorting.

Drawing 12 shows the result of ELISA screening of the mutation for affinity mutation of a carrier beam colony.

Drawing 13 shows an example of the shuttle vector for a manifestation within p569 vector (W. supply from Mr. Nellen) (D. discoideum), i.e., D. disco IDEUMU. This vector has the transposon Tn903 for sorting by an alpha L fucosidase promoter array, the signal sequence, the multi-cloning part, the translation terminator, and G418.

Drawing 14 shows the three-dimensional structure drawn as a polypeptide frame of the NC10 and scFv fragmentation compounded with two influenza neuraminidase subunits analyzed by X-ray diffraction analysis in the resolution of 3A. In this drawing, the linker polypeptide which has connected the heavy chain variable region and the light chain variable region is not drawn. In this crystal structure, two Fv fragments meet at a tooth-back-tooth back, and dimerize two different neuraminidase subunits. In the situation of this scFv fragmentation, it is considered that this dimer Fv molecule is a bifunctional reagent.

Drawing 15 shows the model of two neuraminidase tetramers combined together with four NC10 and scFv dimers analyzed by the electron microscope in the solution.

Dimerization of drawing 16 is carried out at a tooth-back-tooth back, and it shows the model of the bifunctional Fv molecule which met without steric hindrance closely. It sets to this model, the C terminal of a heavy chain is accompanied by the minimum reconstruction of the remaining polypeptide frames, and it is a light chain variable region. It may connect with -13 residue directly.

The scFv dimer connected noncovalent bond-wise [drawing 17] and in covalent bond, respectively is shown typically.

The array recognition number 1 shows an example of mouse Ly-2+Ly-3V domain designed for the manifestation with bacteria.

The array recognition number 2 shows an example of Homo sapiens single-stranded CD8 structure designed for the manifestation in bacteria

******* KUTA like pPOW.**

The array recognition number 3 shows an example of mouse MHCA3 domain designed for the manifestation.

The array recognition number 4 shows the DNA array of 1C3 and scFv which does not contain the linker in pHFA.

The array recognition number 5 shows the DNA array of anti-influenza NC10 and scFv accompanied by the pelB secretion signal, and FLAG and a C terminal peptide.

The array recognition number 6 shows the DNA array of the first 1443 bases of anti-glycophorin 1C3Fab in pHFA of p569 after PCR magnification prepared for connection.

The following are contained in the desirable mode of this invention.

1. The structure of a target affinity polypeptide may be based on a scFv molecule with which one TBR is formed of six loop formations of the surface polypeptide which offers the surface of action (therefore, singularity) to an antigen. In order to contact an antigen and to give a sufficient touch area and compatibility in a desirable mode especially, TBR may be formed of four CDR loop formations (drawing 14). The result of us using NC10 shows that it is easy to carry out mutation of these polypeptides array at random, and to embellish target compatibility.
2. Two functionality or a polyfunctional antibody reagent can be manufactured by connecting each target affinity polypeptide in covalent bond. This covalent-bond-association may be offered by the polypeptide chain of the form of a single-stranded Fv molecule. Singularity is combinable by combining each protein and a field with dimerization or the inclination which is easy to condense. To follow, for example, to connect two single-stranded Fv fragments with the normal sense by the additional polypeptide chain is not needed. This can connect the heavy chain, a light chain and a heavy chain, the heavy chain or light chain, and light chain of different singularity, and can attain them by forming a dimer functional subsequently or floc. Of course, this approach can be used also in order to connect V domain which had required singularity again with the immunoglobulin Mr. domain guided from CD8, T cell receptor fragmentation, or MHC fragmentation.

In a desirable mode, covalent-bond-connection of two Ig Mr. domains like the heavy chain variable region of an antibody and a light chain variable region can be performed, without using, using a linker polypeptide. VH domain and VL domain are connected in covalent bond between the carboxy end of one adjustable (V) domain, and the amino terminus of V domain of another side, without a polypeptide linker spoiling the original form of a scFv bonding site in the case of monomer scFv fragmentation. scFv may be assembled in order of which [VH, a linker and VL fusion protein, or / of VL, a linker, and VH fusion protein] domain. This linker must be a hydrophilic property preferably, in order

to prevent a meeting with hydrophobic V domain front face. A linker may be the length smaller than 25 amino acid residue with the desirable magnitude established by experiential sorting. While a desirable linker array consists of Gly4Ser of a pentamer unit and serine residue raises the hydrophilic property of a peptide frame here, glycine residue gives sufficient flexibility to a linker, in order to take the conformation of a certain range around V DOMEN. In a desirable mode, the meeting object of the covalent-bond nature of a polymer Fv fragment can be especially manufactured without an additional linker polypeptide by removing the intercept of one Ig domain in a connection array. The structure without these linkers is called the domain (tightly coupled domains;TCDs) combined closely here. The number of the amino acid which should be removed can be experientially determined using protein design theory. Drawing 16 is describing TCDs to which two Fv molecules met at the tooth-back-tooth back, and there are two TBRs(es) in the opposite end of a molecule here, and it forms the bifunctional reagent which can carry out cross linking to two target molecules. In this example, in order to obtain a close meeting, even 13 amino acid is removed preferably. The obtained molecule has the inclination to oligomerize even to a dimer at least, in a form from which the interaction between Ig Mr. domains is not prevented in three dimensions although it is close. By adding a polypeptide tail to the amino terminus and carboxy end of isolation, it is thought that the number of TBRs(es) on a molecule can be increased. Moreover, it is clear that it may permute on the whole or selectively by giving the polypeptide array which the deletion polypeptide array removed by the bond part of Ig Mr. domain combined with other locations in Ig Mr. domain. These molecules form a 2-dimensional array and we expect that a bifunctional front face could be offered by it. It is thought that these arrays probably have a specific application as a biological coating means.

The perfect three-dimensional structure of the Homo sapiens who matured or Mouse CD 8 containing heterodimer—an alpha chain and a beta chain is not yet known. The prediction from the crystal structure of heterodimer Homo sapiens CD8alpha has suggested that the alpha chain is similar with the antibody VL chain in topology (Leahy et al., Cell, 1992 and 68, 1145–1162). Although we built the single-stranded variety of a mouse CD8 alpha/beta heterodimer for the manifestation which used bacteria sorting BAKUTA, the same result may be expected even if it uses Homo sapiens CD 8. Original Homo sapiens or CD8 molecule of a mouse is considered to have compatibility only in the molecule of the MHC class I. We predicted what will be become possible to use scCD8 molecule as a stable framework for manufacturing a target affinity polypeptide with the approach of a random library which was indicated in the example. By this approach, scCD8 molecule can be used as a false antibody. Furthermore, this scCD8 molecule can embellish further loop structure equivalent to

magnitude and CDR, in order to provide a contact front face with the framework for less than six CDR loop formations. In a desirable mode, we have planned especially the stable protein framework which can provide a surface of action with four pieces or five CDR loop formations. We have also planned the strategy for applying to other Ig domains. For example, the immunoglobulin Mr. domain of the MHC classes I and II can be made to discover in the form of fusibility, and if this is embellished, it can be used as an immunity modifier.

4. The above qualification to a target affinity polypeptide can be due to the mutation of a coding region by using library sorting and a qualification strategy as shown in drawing 3. this mutation -- low compatibility -- and single-stranded [with large singularity] -- TBP or TBP is ripened and the range of the target molecule which it recognizes is raised. A more important thing is creating the binding affinity range about each member of a library, and each DNA coding region's of the being easily sorted out by well-known methodology, and isolated. What any which such a library shows compatibility to antibody Mr. fragmentation, or show compatibility to ligand, other proteins, an enzyme, or an acceptor, or another peptide is probably included for is assumed. Moreover, although it is not antigenic in itself, the stable core polypeptide which may be embellished by adding a CDR loop formation or a peptide with the compatibility over specific ligand may also be included by transplanting a coding region by recombinant DNA technology. Moreover, the joint front face with the joint property which change of the conformation of protein was brought about and differed from the boss child by change to a framework region which changed is also seen shown.

Construction of the manifestation library with a predetermined target joint property which rearranges and manufactures an antibody fragment (a single-stranded Fv fragment is included) is included in the most common example. It can continue at each sorting process shown in drawing 3, and the expression vector which makes possible the continuous re-combination of a joint domain (VH domain and VL domain are included in a desirable example) can be used appropriately because of pHFA.

5. This invention builds a wide range acceptor, an acceptor Mr. molecule, and the molecule built potentially also for any of avidity, structural integrity, and biological activity by the list with the mutation in an important field, and it may be used in order to sort out. Although it is used in order that an expression in the phage front face of the first stage after being discovered, and the phage rescue from Escherichia coli may act as the monitor of the effectiveness of this approach, an alien system like an eukaryotic cell system also has manifestation capacity. It is shown that yeast (*Saccharomyces SEREVISHIAE*) discovers the monoclonal antibody to VH of NC41, i.e., SUNOIRAMINIDAZE of influenza UIRU, in the bottom of alpha mating factor promoter's control, and DIKUCHIOSUTERIUMU disco IDEUMU (*dictyostelium discoideum*) of slime mold

can discover the recombination protein containing both VH of NC10, and scFv. 6. Specific sorting of a target affinity polypeptide combinable with a specific antigen (LIF, TGF- α , glycophorin, a cell surface marker, or other cell specific surface proteins may be contained) is attained as a result of the expression on an expression vector, for example, an expression in the phage front face of these peptides united with the gene III product. By choosing suitable phage, next, as shown in drawing 5, the round of mutation is presented with these.

In the following examples, in order to cover the whole molecule and to induce run DAMUNI mutation, mutD [of Escherichia coli] and mutT1 variant is used. This is performed by using which standard technique looked at by reference by carrying out the transformation of these Escherichia coli stocks by plasmid DNA. A desirable approach is electric terebration. Or a variant may be transfected in recombination phage by the standard transfection method. After performing the growth land of the Escherichia coli containing these plasmids/phage, phage may be rescued by the standard technique which used the helper phage. Subsequently, it can use for the antigen joint trial for measuring the effect of the various mutation to binding affinity.

Although it is not checked that such mutation causes the base substitution in DNA, the addition of a peptide to the structure of a molecule which changes the number, the magnitude, and the location of the joint field in a molecule may also be included. Probably, compatibility shows the joint property which changed substantially, if the single domain joint unit accompanied by these addition is not specific. The correlation between the mutation in a specific part and binding affinity can be used in order to design the new CDR loop formation and new framework region for a leading target affinity polypeptide therapy-wise and diagnostically.

the cause of the first step of a process of going to the manifestation by which the "antibody gene" was controlled in the range of this invention again -- ** -- the manifestation of the recombination protein from a recombination cell under direct control of the becoming antigen or a certain ligand is also included.

7. Two functionality or a polyfunctional reagent can be sorted out using the above-mentioned library technique. A target affinity polypeptide may be expressed for affinity sorting by association through a polypeptide tail. Sorting based on the compatibility over two or more different target antigens or haptens will sort out the single molecule which has two joint front faces in the location where the same molecules differed. These joint front faces may lap. In order to build the library for sorting out two functionality or a polyfunctional reagent, the strategy of the site specific mutation applied to two or more front faces of a protein molecule and random mutation may be used. In single-stranded Fv or a case single-stranded [CD / 8], a field desirable for

mutation is the counter PERT of objection in a CDR loop formation and the other end of a scFv molecule. Mutation desirable in the case of a Fab molecule is a thing in a CDR loop formation and the counter PERT loop formation of objection in the other end of a stationary domain.

Unless it mentions specially outside, all the standard methods mentioned here are indicated by Sambrook et al. and the "molecular-cloning-A laboratory manual" of 1990.

Example 1 The polypeptide linker of different die length was used. Target affinity PO as a single-stranded Fv fragment Construction and a manifestation of RIPEPUCHIDO The parent scFv fragmentation of NC10 (monoclonal antibody which recognizes the neuraminidase (NA) molecule on nine shares of influenza viruses N) was designed and built, and it was made discovered in Escherichia coli (array recognition number 5). Synthetic protein was led to peri PURAZUMU of Escherichia coli by secretion signal PelB of an amino terminus, and met with the insoluble film fraction by it there. The tail of the sucrose octaacetate (FLAG;IBI USA) was united with the carboxyl terminus of this scFv, and it used in order to act as the monitor of this scFv through the continuing purification process. This agent is two functionality and has singularity to both neuraminidase and anti-FLAG antibody.

This scFv-NC10 protein was refined by dissolving and applying an Escherichia coli film fraction to a column chromatography continuously by hydrochloric-acid guanidinium. It was shown by the size abatement HPLC of refined scFv-NC10 that scFv fragmentation produces two peaks corresponding to the magnitude of a monomer (27kDa) and a dimer (54kDa). Furthermore, to combining a monomer mold with N9NA and forming the complex of 320kDa(s), it combined with N9NA and the dimer mold formed the complex of 640kDa(s). 640kDa complex consists of four scFv molecules combined with two NA molecules to the complex of 320kDa(s) consisting of four scFv molecules combined with single NA molecule. By the electron microscope, it was checked that two neuraminidase tetramers have joined together closely with four bifunctional scFv dimers (drawing 15). Electron microscope observation of high resolution was performed about tern N9 (birds) stock of the influenza neuraminidase which forms compound between the scFv structures of NC10 and Mab. Here, the HOHOTANGU stainless steel acid potassium (potassium phopho-tungstate) (pH7.0) or the uranyl acetate (pH4.0) dyed this molecular complex (contrast-izing).

Imaged the molecular complex with the monoclonal (32/3, NC35 and NC41) Fab of the same N9NA, and the molecular complex with all the monoclonals (32/3, NC41 and NC10) IgGs. It is based on the extensive experiment which we conducted before. We It was the structure which the head pair of the neuraminidase which combined the image of N9 Na-scFv complex with four bridge formation scFv dimers in the field and the field closed, and this

association was analyzable, when it was carried out so that the molecular complex with which it filled up closely might maintain four-fold point symmetry (drawing 15). This image analysis of an N9 Na-scFv molecular complex is just in agreement with the molecular weight of the complex observed in the solution, and Mr 610,000.

Meeting ***** close between two scFv molecules connected with the revolving shaft of a duplex was proved by the X diffraction (drawing 14) of the crystal with which scFv forms neuraminidase and complex. Two possible dimer structures can be considered. In the first example, by the single polypeptide chain with a peptide tail, VH and VL domain by which the code was carried out form scFv of two functionality, and meet in noncovalent bond with scFv molecule with this another (drawing 17). the second example -- every -- VH and VL domain which form an antigen joint front face (TBR) in Fv -- a noncovalent bond ---like -- meeting -- ***** -- this -- covalent bond of the two Fv(s) is carried out by the linker polypeptide (drawing 17).

What VH of the dimer which carried out covalent bond by molecule model creation research (drawing 14) to VH of the dimer which met in noncovalent bond, and the distance between VL domains being at least 35A, and the distance between VL domains will be less than 25A is shown. Residue assumed the distance in which distance between the adjoining peptide linkage is made into 3.8A, and a linker may spread theoretically to be 54, 36, 18, and 0A about linker pPOW/scFv-NC10 structure of 15, 10, 5, and 0, respectively, and we investigated the type of the scFv-NA complex formed when it combines with an antigen by the linker of the die length from which scFv protein differs.

A series of scFv-NC10 proteins which shortened the die length of a linker were created (drawing 5). The first pPOW-scFv-NC10 structure has the polypeptide linker which consists of three pentamer unit Gly4Ser(s) (this pPOW-scFvNC10 structure is called the linker of 15 residue, and VH15VL). residue linker pPOW-scFv-NC10 structure of structure (VH10VL) VH5VL and VHVL which build a linker deficit mutant and have 2, 1, and 0 unit by removing each of these pentamer units in order -- calling -- it was formed. Furthermore, scFv-NC10 structure was created by making the first beta chain (the first 13 amino acid) of VL domain suffer a loss so that the carboxyl terminus of VH domain might be combined with a direct VL domain (VH-13VL).

Detail of the pPOW-scFv-NC10 construction which shortened linker length pPOW-scFv-NC10 structure was continuously digested according to a manufacturer's specification using BstEII (New England Biolabs) and SacI (Pharmacia), and the polypeptide linker was removed. Electroelution of the pPOW-scFv-NC10DNA without the linker by which restriction enzyme digestion was carried out was carried out from agarose gel 0.8%, and it was condensed by 0.3M sodium acetate and precipitate using the ethanol of the amount of 2.5 time volume. When an synthetic oligonucleotide incubated for 30

minutes at 37 degrees C during T-four polynucleotide kinase (Pharmacia) of 0.5 units, 1mMATP, and One-Phor-All buffer plus (Pharmacia), phosphorylation of the 5'end was carried out. The complementary phosphorylation oligonucleotide primer (drawing 6) of a couple was beforehand mixed by the equimolar ratio, and the DNA duplicitas which carries out the code of the single-stranded linker from which die length changed-was formed. These duplicitas was connected into the pPOW-scFv-NC10 plasmid by which limit decomposition was carried out by BstEII-SacI using the ligation kit (Amersham ligation kit) of Amersham. In order to have created the VH-13VL structure, different approach a little was needed. the oligonucleotide primer (drawing 6) which continues and spreads in a deficit VL domain -- building -- this -- FLAG -- it was doubled and used combining the specific oligonucleotide primer (drawing 6), and the VH-13VL fragmentation of scFv-NC10 was amplified by PCR. It connected using the ligation kit made from Amersham (Amersham ligation kit) into the pPOW-scFv-NC10 plasmid which digested this magnification object by BstEII and EcoRI, and was digested similarly. Extract purification was carried out by the phenol/chloroform of the amount of volume [mixture / this / connection], and it was made to precipitate in 0.3M sodium acetate and the ethanol of the amount of 2.5 time volume. This connection DNA was re-suspended in [of 20ml] H₂O, and the transformation of that sample 5ml was carried out into Escherichia coli DH5a (supE44, hsdR17, recA1, endA1, gryA96, thi-1, relA1) and LE392 (supE44, supF58, hsdR14, lacY1, galK2, galT22, metB1, trpR55). The cell was shaken in 1ml LB culture medium for 1 hour, and the plate was carried out to 2xYT culture medium containing 100mg [/ml] ANMPISHIRIN. The recombination clone was identified by PCR screening using the oligonucleotide turned to the PelB leader sequence and FLAG array of a pPOW vector. The DNA array of the shortened linker field was checked in double stranded DNA by sequencing which used C KENAZE (Seauenase) 2.0 (United States Biochemical).

Protein manifestation of scFv-NC10 protein which has a compaction linker It was made to increase by 30-degree C SB culture medium overnight, and LE392 by which the transformation was carried out was diluted to 1:10, and was inoculated into new SB culture medium. It was made to increase shaking a culture at 30 degrees C until the absorbance (A₆₀₀) in 600nm was set to about 4. About the remaining time amount of an induction period (it continues for 4 hours until A₆₀₀ is set to 7), temperature was raised to 42 degrees C. Cells were collected from the centrifugal separator (Beckman JA10, 6,000rpm 15 minutes), and supernatant liquor fractionation was removed. By 10% of the original volume, the cell pellet was re-suspended in 20% shoe cloth, 10 mM Tris-HCl, and pH7.5, and was left in Hikami for 5 minutes. It incubated in Hikami, and for 10 more minutes is the above, and made and carried out [EDTA was added even to the last volume of 5mM(s),] centrifugal separation of

this mixture, and the cell was pelletized. Supernatant liquor was thrown away, the cell pellet was re-suspended underwater, centrifugal separation of this mixture was carried out again, and the supernatant liquor containing per PURAZUMIKKU protein was removed. In this way, re-suspended the obtained cell pellet underwater, and it was made to dissolve with a supersonic wave (for it to be 1 time about BASUCHI for 30 seconds at 6 times and small-scale preparation in a burst of 30 by large-scale preparation), and was left in Hikami for 5 minutes. Aqueous phase was collected as dissolution cell room fractionation after centrifugal separation, and the pellet contained insoluble film joint fractionation. In order to check the manifestation of scFv-NC10, Western blotting which used SDS-PAGE under reduced condition and used the anti-FLAG monoclonal antibody M2 (drawing 7) for the list analyzed all the cell melts from each clone. The single electropositive band which moves by 28, 29, 31, and 32kDa(s) was observed (drawing 7 , lane 13-16). Such molecular weight correlated pPOW-scFv-NC10 structure with the anticipation molecular weight of the scFv-NC10-FLAG fusion protein compounded combining respectively a linker with 0, 5, 10, and 15 residue. scFv-NC10 protein which has a linker with 0, 5, and 10 residue showed the same description as the protein which has the linker of 15 residue. scFv-NC10-FLAG fusion protein was combined with the non-dissolved film of Escherichia coli, and the abbreviation one half was able to be solubilized by making it processing by hydrochloric-acid guanidinium.

This fusibility product was refined by the chromatography on the compatibility matrix which contains a specific antibody in gel filtration and a list to a Mono-Q top or a tail. About this purification object, they are SDS-PAGE, steric exclusion chromatography (SE-HPLC), ultra-centrifugal separation analysis, and a parent antigen (influenza noy lamination DAZE).

It was alike and characterization was performed by electron microscope observation of the receiving avidity and the complex formed between the antigen and this agent. The magnitude check of this product was carried out by the bridge formation experiment.

The property was summarized and shown in drawing 8 .

Example 2 Construction of a mouse and Homo sapiens scCD8 (Gly4Ser) To V Mr. domain (array recognition number 1) which has the nucleotide of the addition which carries out the code of the three linkers, it used and homology's primer (the available database array was used), the alpha chain which includes only V Mr. domain of a mouse CD 8 by PCR in vent polymerase (Vent polymerase), and the beta chain were amplified independently. After annealing two separate domains, this product was expanded using dNTPs and polymerase.

scCD8 gene was amplified by 3'end at the MscI part and 5'end using a new primer including a SaII part. This single-stranded product was cloned in the

pPOW vector which it was digested by MscI and SaII, and was subsequently digested by MscI and SaII. Protein composition of a high level was obtained in pop2136 which is an Escherichia coli host cell strain. In order to increase composition of the product which cleft correctly, qualification of an amino terminal was designed. This was attained by changing the amino terminal residue of mouse CD8 alpha chain into a serine from a lysine (Homo sapiens's CD 8 amino terminal residue is a serine). Escherichia coli host cell strain pop2136 (all cell melts are shown)

The composition of scCD8 in ***** pPOW can be seen to drawing 10 . scCD8 compounded product was detected by anti-CD8 antibody which recognizes only the protein of a right form in conformation.

Homo sapiens and scCD8 V Mr. domain where DNA which carries out the code of the V Mr. domain of mature alpha chain protein has the nucleotide of the addition which carries out the code of the three (Gly4Ser) linkers to Taq polymerase, and includes the restriction enzyme parts MscI and BamHI (array recognition number 2)

It was alike, and it received and was amplified by PCR using homology's primer (the available database array was used). V Mr. domain of CD8 beta chain was directly amplified by PCR using a primer including BamHI from DNA isolated from blood, and an EcoRI restriction enzyme part. Each two products were connected into the pPOW vector which it was digested with the suitable enzyme and was subsequently digested by MscI and EcoRI.

The DNA array of each single-stranded CD8 structure was checked by sequencing of double stranded DNA. This nucleotide sequence is shown in the array recognition numbers 1 and 2. In this example, this vector orders it composition of scCD8 which has a C terminal peptide tail for a diagnostic application and a joint application (affinity purification is included). The following are contained in the desirable technique which acts as the monitor of the biological activity of scCD8 product.

(a) For example, ultra-centrifugal separation using association to a cell table region child like alpha3 domain of binding affinity direct measurement or all the cells of the protein using a biosensor technique, beta 2-microglobulin, or an MHC class I molecule, or its fragmentation.

(b) The joint trial to the MHC class I molecule (peptide addition was carried out) discovered by the RMA-S intracellular which used the C terminal peptide tail for the diagnostic marker.

(c) For example, a functional inhibition trial which acts as the monitor of the change of the peptide dependency effectiveness over the IL2 production in the case of activation of a T cell.

example 3 Construction of anti-glycophorin 1C3 which does not contain a linker parent IC3 antibody and a scFv derivative -- the [international application number] -- it is indicated by PCT/AU 93/No. 00228.

an oligonucleotide -- N -- 2034

(5'-ACGTAGGTCACCGTCGCCTCCGACATCGTCATGTCACAGTCTCCATCCTC

-- any -- inclusion -- a linker -- not containing -- a ** -- one -- C -- three
 -- VL -- five -- ' -- an array -- the beginning -- 30 -- bases -- having
 joined together -- one -- C -- three -- VH -- three -- ' -- an end -- the
 last -- 15 -- bases -- receiving -- a complementarity -- having -- as --
 compounding -- having had .

The oligonucleotide N2035

(5'-TTTATAATCTGCGGCCGCCGATTAATTTC-3') was compounded so that
 it might have a complementarity to the 1C3VL array on a reverse chain in the
 perimeter of the NotI part near the 3'end.

These two oligonucleotides were used for polymerase chain reaction with 1C3
 template DNA, in order to manufacture 1C3 product of the 3'-VH array
 arranged in parallel by 5'-VL which adjoins BstEII and a NotI restriction
 endonuclease part.

The obtained fragmentation was connected with the vector pHFA including
 1C3 and a scFv array which digested by BstEII and NotI beforehand and
 removed interleaved array after incubating the PCR product which has the
 restriction endonuclease parts BstEII and NotI. This connection product was
 used in order to carry out the transformation of the Escherichia coli stock TG
 1. It was checked that the transformant colony containing an insert includes
 the DNA array shown in the array recognition number 4.

This gene structure was discovered by being discovered in this vector or
 related vectors, and introducing 1C3 coding region into heat inductivity
 expression vector pPOW, when it was introduced into a non-controlling
 Escherichia coli stock and was guided by IPTG.

Example 4 Mutation using the variant of Escherichia coli NC10 and the scFv
 plasmid which carries out the code of the manifestation of recombination
 anti-neuraminidase antibody NC10 and scFv were introduced into Escherichia
 coli mutD by the electric terebration. The mutant was manufactured by
 presenting with a sample the mutation cycle shown in drawing 11 . Only 50
 generations increased with the characteristic phase in YT+AMP+TET (in order
 to induce the mutation of plasmid DNA), and, subsequently these were rescued
 using the helper phage. The rescued phage is hung on the immunity tube which
 coated the 10microg [/ml] antigen beforehand. Wash by PBS etc., remove
 uncombined phage and the phage combined specifically is eluted in 100mM
 triethylamine. 1M Tris-HIROPOROKISHI methyl monomethylamine of 0.5 volume --
 HCl It collects in pH7.5. Subsequently, it transfected into the mutD cell by the
 standard method (unless it refuses especially, all the standard methods that
 make reference here are indicated by Sambrook et al. and the
 "molecular-cloning-A laboratory manual" of 1990). moreover, a cell -- a
 logarithm -- growth of 50 generations was performed again, maintaining to

phase growth. The phage titer after carrying out the mutation sorting round (this example 3 times) of a suitable count is 107 to 108 phage / ml. After the last panning process, the eluted phage was transfected into the Escherichia coli TG1 cell, it increased in advance of phage rescue, and each colony scattered and isolated by the plate of a YT+AMP+ glucose was analyzed by ELISA on the "flu" virus or glycoporphin. Subsequently the colony which discovered the non-wild type on the level of ELISA activity was amplified, and the DNA array was determined, and this phage was transfected into available Escherichia coli HB one 2151 from the American type culture collection for the manifestation of fusibility. This phage was transfected by HB [2151] by the standard method, it increased in YT+AMP (100microg/(ml)), subsequently each colony where each phage sample was sorted out was guided at 37 degrees C for 4 to 16 hours using IPTG (isopropyl thiogalactoside) of 1mM, and arbitration incubated at 4 degrees C succeedingly for 16 hours. This culture supernatant and a periplasm extract, a cell membrane, and cytoplasm were collected, and it analyzed about the manifestation of a recombination gene as mentioned above (Power et al., 1992, Gene).

example 5 the [international application number] -- the number publication was carried out at PCT/AU 93/00228, as recombination 1C3 and scFv in FAJIMIDO pHFA made and prepared (glycoporphin affinity antibody coding region) were indicated in the example 4, the random mutation within mutD Escherichia coli was presented with it, and the sorting protocol was applied similarly. However, in this sorting, it is a solid phase matrix (an ELISA plate and immunity tube **** are a latex bead).

Coating with the PBS solution (10microg/(ml)) of Glycoporphin A is included. The result of the ELISA screening for sorting out each clone is shown in drawing 12. The contention ELISA trial using detection by the anti-FLAG antibody was performed to the colony where it sorted out after mutation. A table 1 shows that the relative compatibility over the antigen (asialo glycoporphin) of the discovered protein increased.

表 1

クローン化された 組換 s c F v	突然変異	親和性 μM (オフ・レート)
1 C 3	w t	6 2
1 C 3 ・ A 1 3		4 0
1 C 3 ・ B 7		2 9

Example 6 The mutT stock of Escherichia coli was transfected in the scFv library in the FAJIMIDO vector pHEN (medical research Counsell, U.K.), and it

was processed like examples 4 or 5 for detection of scFv in mutation and the embellished combining ability, and sorting. It sorts out about a glycoporphin binder. In order to increase the range of an available glycoporphin affinity antibody, the original scFv library was used as a starting point of affinity sorting of mutation and a phage expression library. Two peculiar anti-glycoporphins scFv sorted out from the original scFv phage expression library have the presumed amino acid sequence the field of the Vk4 chain in which it was shown that mutation is carried out after that is indicated to be, and this is shown in a table 2.

表 2

FTASTGDVPDRFSGSGSGTDFTLRISSSLQAEDVAVYYCQQASVFP
CIYWNPDSPDRFSGSGSGTDFTLRISLQAEDVAVYYCQQASVFP

Affinity maturation of each molecule of these was attained by using a mutation (mutD5) affinity sorting cycle, as shown in drawing 11.

Change in which it results to the subset of a mutation molecule is shown in a table 3.

表 3

本来のライブラリ

から選別された s c F v	突然変異 A. A. (位置)	親和性 μ M (オフ・レート)
A 9	w t	4 8
A 9. 5	S - V (98)	1 5
A 9. 1 3	G - D (63)	2 4
	V - S (64)	0. 06
E 3	w t	1 8
E 3. 1	S - Q (82)	9
E 3. 2	S - T (83)	2
C 1 2	w t	1 1
C 1 2. 1	G - Q (48)	3 5
C 1 2. 2	L - G (15)	1

Example 7 The manifestation of the antibody fragment coding region in the inside of D. disco IDEUMU is based on the vector AV1 built from VH coding

region indicated to the parent vector p569 (donation from Mr. W.Nellen of the Max plank lab in Germany Munich), and the following. The vector p569 is shown in drawing 13 . This is one family of the Escherichia coli D. disco IDEUMU shuttle vector using the signal sequence for secretion of the "ligand affinity peptide" discovered by an alpha-L fucosidase promoter and cell surface. A table 4 shows the result of the immuno dot blot of a manifestation of influenza NC41VHFLAG detected by the anti-FLAG antibody (M2).

VH coding array of monoclonal antibody NC41 was amplified by the polymerase chain reaction using the following oligonucleotide array.

N849 5'CCTTGCCCTGCAGGTGCGACCTATGGACAGGTGCAGCTGCAGCAG 3'

N863

5' TTACCATGGTTACTTGACCTTAATCAGCAGGACAAATGAAATAAATTTATCATCA

CATCTTTATAATC 5'

N849 includes the complementary array to the amino terminal of an NC41VH coding region with the Sall limit part suitable for cloning to an alpha-L-fucosidase signal sequence, a cleavage part, and an expression vector p569.

N863 includes the complementary array to the FLAG coding array of NC41VH with the NcoI limit part and translation halt codon for a transformer membrane hydrophobic array and cloning.

DNA of a vector pAV569 (donation from Mr. W.Nellen of the Max plank lab of the Germany Martin slide) was digested by limit **** NcoI and Sall, and the standard technique of agarose electrophoresis and a phenol extract refined the cut vector.

It was amplified by PCR, NC41 VH-FLAG digested with the restriction enzyme was connected into the vector, and the transformation of this mixture was carried out to Escherichia coli. The recombinant colony was sorted out on the ampicillin content YT plate, recombination plasmids were collected, and it refined and identified using the standard technique. This recombination plasmid calls pAV1.

The transformation was carried out into the resting cell of D. disco IDEMU by using the food intake method (feeding method) indicated by Friendlender and Mella in the recombination plasmid pAV1 GB-2159821.

Recombinant D. disco IDEMU was sorted out using the 10microg [/ml] antibiotic G418 on the DMB culture medium. Recombinant D. disco IDEMU AMOEBAE (D. Discoideum amoebae) was proliferated by 2ml culture of the DMB culture medium containing G418 [10microg //ml]. Dot blot analysis was performed about 100microl aliquot of a culture supernatant after growth of 48 hours at 22 degrees C, and existence of the NC10 VH-FLAG antibody fragment under culture was detected using the anti-FLAG antibody. The result is shown in a table 4.

表 4

D. ディスコイデウムにおける

NC10V_H - FLAGの発現

抗FLAG抗体を用いたドットブロット免疫検出

D. ディスコイデウムのクローン# 抗体による検出

陰性対照	—
陰性対照	—
陽性対照	+++
9C組換えD. ディスコイデム	+
9D "	—
9E "	++
9F "	—
9G "	++
8B "	+++
8C "	—
8D "	+++
8E "	+++
8F "	—
8G "	+++
7D "	+
7E "	—
7F "	+
7G "	—

— : 反応なし

+++ : 強い反応

+ : 弱い反応

Example 8 Construction of the recombination vector containing 1C3Fab for the manifestation in D. disco IDEUMU. The structure of a parent vector (p569) was shown in drawing 13 , this vector was embellished by the clearance and re-connection of BamHI/BglII fragmentation by limit digestion, and peculiar XbaI and the SspI part for carrying out cloning of the antibody coding region built by PCR using 1C3Fab as a following primer and mold were left behind.

5' CAGGTCGACTCTAGAGTATGGGAGGTGAGGCTTCTCGAG 3'

5' AAATTTATAATTATTTATCATCATCATCTTTATAATC 3'

Since this Fab has combined the avidity (TBRs) about anti-FLAG and an anti-EEF antibody with the glycophorin list, it is a polyfunctional polypeptide. Purification standard for the construction in Escherichia coli, connection, and a transformation protocol were performed following limit digestion of an PCR product. D. The transformation of disco IDEUMU is G418 (GENECHISHIN (geneticin)) by the standard method well-known to this contractor announced with the Escherichia coli by which the food intake transformation was carried out by reference like (GB-2159821A reference), calcium phosphate crystallization (Nellen et al., Mol.Cell.Biol., 1984 and 4, 2890-2898), or the electric terebration (Howard et al., 1988 and 16, 2613-2623).

It is carried out with the upper sorting.

It will be understood clearly that the general range of this invention is not limited to the specific example stated to the detail above.

Array-verify number 1 file: B:**POWLY23V. array explanation: JLApeIB Ly-2+Ly-3 V DO connected with MscI-SalI which has a FLAG tail Maine base number: The 1 - 849 all number of bases: 849

```

      M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGC

      M A K P Q A P E L R I F P K K M D A E L
61 ATGGCCAAGC CACAGGCACC CGAACTCCGA ATCTTTCCAA AGAAAATGGA CGCCGAAC

      G Q K V D L V C E V L G S V S Q G C S W
121 GGTCAGAAGG TGGACCTGGT ATGTGAAGTG TTGGGGTCCG TTTCGCAAGG ATGCTCTTG

      L F Q N S S S K L P Q P T F V V Y M A S
181 CTCTTCCAGA ACTCCAGCTC CAAACTCCCC CAGCCCACCT TCGTTGTCTA TATGGCTTC

      S H N K I T W D E K L N S S K L F S A P
241 TCCCACAACA AGATAACGTG GGACGAGAAG CTGAATTCGT CGAAACTGTT TTCTGCCAT

      R D T N N K Y V L T L N K F S K E N E C
301 AGGGACACGA ATAATAAGTA CGTTCTCACC CTGAACAAGT TCAGCAAGGA AAACGAAGC

      Y Y F C S V I S N S V M Y F S S V V P A
361 TACTATTTCT GCTCAGTCAT CAGCAACTCG GTGATGTACT TCAGTTCTGT CGTGCCAGT

      L Q G G G G S G G G G S G G G S L I (
421 CTTCAGGGTG GCGGAGGCTC AGGCGGTGGT CGATCAGGTG GCGGCGGATC TCTCATTC

      T P S S L L V Q T N H T A K M S C E V
481 ACCCCTTCGT CCCTGCTGGT TCAAACCAAC CATACGGCAA AGATGTCCTG TGAGGTTA

      S I S K L T S I Y W L R E R Q D P K D
541 AGCATCTCTA AGTTAACAAG CATCTACTGG CTGCGGGAGC GCCAGGACCC CAAGGACA

      Y F E F L A S W S S S K G V L Y G E S
601 TACTTTGAGT TCCTGCCCTC CTGGAGTTCT TCCAAAGGAG TTTTGTATGG TGAAAGTG

      D K K R N I I L E S S D S R R P F L S
661 GACAAGAAAA GAAATATAAT TCTTGAGTCT TCAGACTCAA GACGGCCCTT TCTCAGTA

      M N V K P E D S D F Y F C A T V G S P
721 ATGAATGTGA AGCCAGAGGA CAGTGACTTC TACTTCTGCG CGACGGTTGG GACCCCC/

      M V F G T G T K L T V V D Y K D D D D
781 ATGGTCTTTG CGACAGGGAC GAAGCTGACT GTGGTTGATT ACAAGGACGA CGATGAC/

      * S T
841 TAGTCGACA

```

Array-verify number 2 file: B:**CD8ACD8B. array explanation: Homo sapiens single-stranded CD8 base number in pPOW (pelB CD8a and CD8b V dom): The 1 - 822 all number of bases: 822

```

      M K Y L L P T A A A C L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG

      H A S Q F R V S P L D R T W N L G E T V
61 ATGGCCAGCC AGTTCCGGGT GTCGCCGCTG GATCGGACCT GGAACCTGGG CGAGACAGTG

      E L K C Q V L L S N P T S G C S W L F Q
121 GAGCTGAAGT GCCAGGTGCT GCTGTCCAAC CCGACGTCGG GCTGCTCGTG GCTCTTCCAG

      P R G A A A S P T F L L Y L S Q N K P K
181 CCGCGCGGCG CCGCCGCCAG TCCCACTTC CTCCTATACC TCTCCCAAAA CAAGCCCAAG

      A A E G L D T Q R F S G K R L G D T F V
241 GCGGCCGAGG GGCTGGACAC CCAGCGGTTT TCGGGCAAGA GGTGGGGGGA CACCTTCGTC

      L T L S D F R R E N E G Y Y F C S A L S
301 CTCACCCTGA GCGACTTCCG CCGAGAGAAC GAGGGCTACT ATTTCTGCTC GGCCCTGAGC

      N S I M Y F S H F V P V F L P A G G R G
361 AACTCCATCA TGTACTTCAG CCACTTCGTG CCGGTCTTCC TGCCAGCGGG CGGCCGCGGT

      S G G G G S G G G G S L Q Q T P A Y I K
421 TCAGGTGGAG GTGGATCCGG AGGCGGTGGA TCTCTCCAGC AGACCCCTGC ATACATAAAG

      V Q T N K M V M L S C E A K I S L S N M
481 GTGCAAACCA ACAAGATGGT GATGCTGTCC TGCGAGGCTA AAATCTCCCT CAGTAACATG

      R I Y W L R Q R Q A P S S D S H H E F L
541 CGCATCTACT GGCTGAGACA GCGCCAGGCA CCCAGCACTG ACAGTCACCA CGAGTTCTTG

      A L W D S A K G T I H G E E V E Q E K I
601 CCCCTCTGGC ATTCCGCAAA ACGGACTATC CACCGTGAAC AGCTCGAACA GGAGAACATA

      A V F R D A S R F I L N L T S V K P E D
661 GCTCTGTTTC GGGATGCAAG CCGGTTTATT CTCAATCTCA CAAGCGTGAA CCCGGAAGAC

      S G I Y F C M I V G S P E L T F G K C T
721 ACTGCCATCT ACTTCTGCAT GATCGTCGGG AGCCCCGAGC TGACCTTCCG GAAGCGAACT

      Q L S V V D Y K D D D D K .
781 CAGCTGAGTC TCCTTGATT AAGGACCAAC GATGACAAGT AG

```

Array-verify number 3 file: B:**MHCA3. array explanation: MHCI a3 H-2K
domain base number in pPOW pelB Msc-EcoRI (with no FLAG): The 1 - 371 all
number of bases: 371

```

      M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG

      M A K A H V T H H R R P E G D V T L R C
61 ATGGCCAAGG CCCATGTCAC CCATCACCGC AGACCTGAAG GTGATGTCAC CCTGAGGTGC

      W A L G F Y P A D I T L T W Q L N G D E
121 TGGGCCCTGG GCTTCTACCC TGCTGACATC ACCCTGACCT GGCAGTTGAA TGGGGACGAG

      L T Q E M E L V E T R P A G D G T F Q K
181 CTGACCCAGG AAATGGAGCT TGTGGAGACC AGGCCTGCAG GCGATGGAAC CTTCCAGAAG

      W A S V V V P L G K E Q K Y T C H V E H
241 TGGGCATCTG TGGTGGTGCC TCTTGGGAAG GAGCAGAAGT ACACATGCCA TGTGGAACAT

      E G L P E P L T L R W G K E E P P S S T
301 GAGGGGCTGC CTGAGCCCCT CACCCTGAGA TGGGGCAAGG AGGAGCCTCC TTCATCCACC

      K * N
361 AAGTAGAATT C
```

From the Hind III part in 1C3pHFA without a linker built in array-verify number
4pHFA to initiation of gene 3 array

```

1   aag ctt gca tgc aaa ttc tat ttc aag gag aca gtc ata ATG AAA TAC
    L  L  P  T  A  A  A  G  L  L  L  L  A  A  Q  P
49  CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG
    A  M  A  E  V  K  L  Q  E  S  G  G  G  P  V  Q
97  GCC ATG GCC GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGA GGT GGC CCG GTA CAA
    P  G  G  S  L  K  L  S  C  A  A  S  G  F  D  F
145 CCT GGA GGA TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCA GGA TTC GAT TTT
    S  R  Y  W  M  N  W  V  R  R  A  P  G  K  G  L
193 AGT AGA TAC TGG ATG AAT TGG GTC CGG CGG GCT CCA GGG AAG GGG CTA
    E  W  I  G  E  I  N  Q  Q  S  S  T  I  N  Y  S
241 GAG TGG ATT GGA GAA ATT AAT CAA CAA AGC AGT ACG ATA AAC TAT TCG
    P  P  L  K  D  K  F  I  I  S  R  D  N  A  K  S
289 CCA CCT CTG AAG GAT AAA TTC ATC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAA AGT
    T  L  Y  L  Q  M  N  K  V  R  S  E  D  T  A  L
337 ACG CTG TAC CTG CAA ATG AAC AAA GTG AGA TCT GAG GAC ACA GCC CTT
    Y  Y  C  A  R  L  S  L  T  A  A  G  F  A  Y  W
385 TAT TAT TGT GCA AGA CTT TCT CTT ACT GCG GCA GGG TTT GCT TAC TGG
    G  Q  G  T  L  V  T  V  A  S  D  I  V  M  S  Q
433 GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACC GTC GCC TCC GAC ATC GTC ATG TCA CAG
    S  P  S  S  L  A  V  S  V  G  E  K  V  T  M  S
481 TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG TCA GTA GGA GAG AAG GTC ACT ATG AGC
    C  R  S  S  Q  S  L  F  N  S  R  T  R  K  N  Y
529 TGC AGA TCC AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC
    L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  S  P  K  P  L  I
577 TTG ACT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CCG CTG ATC
    Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R  F  T  G
625 TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
    S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  V  Q  A
673 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT
    E  D  L  A  D  Y  Y  C  K  Q  S  Y  N  L  R  T
721 GAA GAC CTG GCA GAT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTT CGG ACG
    F  G  G  G  T  K  L  E  I  N  R  A  A  A  D  Y
769 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATT AAT CGG GCG GCC GCA GAT TAT
    K  D  D  D  D  K  .  A  A  .  T  V  E  S  C  L
817 AAA GAT GAT GAT GAT AAA TAG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA
    A  K
865 GCA AAA.....

```

Array-verify number 5

pelB signal sequence

M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCG

H1 Pst1 H10
M A Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V
ATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTG

H20 H30
R M S C K A S G Y T F T N Y N M Y W V K
AGGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAATTACAACATGTACTGGGTAAAA

H40 H50 H52A
Q S P G Q G L E W I G I F Y P G N G D T
CAGTCACCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAATTTTTTATCCAGGAAATGGTGATACT

H60 H70
S Y N Q K F K D K A T L T A D K S S N T
TCCTACAATCAGAAGTTCAAAGACAAGGCCACATTGACTGCTGACAAATCCTCCAACACA

H80 H82A H82C H90
A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R
GCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGA

H100 H100E BstE2
S G G S Y R Y D G G F D Y W G Q G T T V
TCGGGGGGCTCCTATAGATACGACGGAGGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC

H110 linker L1
T V S G G G G S G G G G S G G G S D I
ACCGTCTCCGGTGGTGGTGGTTCGGGTGGTGGTGGTTCGGGTGGTGGTTCGGATATC

SacI L10 L20
E L T Q T T S S L S A S L G D R V T I S
GAGCTCACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGT

L30 L40
C R A S O D I S N Y L N W Y Q Q N P D G
TGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAATTATTTAACTGGTATCAACAGAATCCAGATGGA

L50 L60
T V K L L I Y Y T S N L H S E V P S R F
ACTGTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAATTTACTCAGAAAGTCCCATCACGGTTC

L70 L80
S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D
AGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAT

L90 L100
I A T Y F C Q Q D F T L P F T F G G G T
ATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGATTTTACGCTTCCGTTACGTTCCGGAGGGGGGACC

XhoI FLAG EcoRI
K L E I R D Y K D D D D K * *
AAGCTCGAGATAAGAGACTACAAAGACGATGACCATAAATAAGAATTC

Array-verify number 6 file: A:**1C3FAB. array explanation: Anti-glycophorin

base number in 1C3 Fab: The 1 - 1443 all number of bases: 1443

```
1  aaaaaagcGG CCCAGCCGGC CATGGCCGAG GTGAGGCTTC TCGACTCTGG AGGTGGCCCCG
61  GTACAACCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGCCT CAGGATTCCA TTTTAGTAGA
121 TACTGGATGA ATTGGgtcCG GCGGGCTCCA GGAAGGGGC TAGAGTGGAT TGCAGAAATT
181 AATCAACAAA GCAGTACGAT AAACCTATTCG CCACCTCTGA AGGATAAATT CATCATCTCC
241 AGAGACAACG CAAAAAGTAC GCTGTACCTG CAAATGAACA AAGTGAGATC TGAGGACACA
301 GCCCTTTATT ATTGTGCAAG ACTTTCTCTT ACTGCGGCAG GGTTCGCTTA CTGGGGCCAA
361 GGGACTCTGG TCACTGTCTC TGCAGCCAAA ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC
421 CCTGGATCTG CTGCCCCAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGCCTGGT CAAGGGCTAT
481 TTCCCTGAGC CAGTGACAGT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCAGCGG TGTGCACACC
541 TTCCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACTCTGAGCA CCTCAGTGAC TGTCCCCTCC
601 ACCACCTGGC CCAGCGAGAC CGTCACCTGC AACGTTGCCC ACCCGGCCAG CAGCACCAAG
661 GTGGACAAGA AAATTgaaga attttaatta aaacatggaa ataaaGTGAA ACAAAGCACT
721 ATTGCACTGG CACTCTTACC GTTACTGTTT ACCCCGGTAA CCAAAGCCGA CATCGTCATG
781 TCACAGTCTC CATCCTCCCT GGCTGTGTCA GTAGGAGAGA AGGTCACTAT GAGCTGCAGA
841 TCCAGTCAGA GTCTGTTCAA CAGTAGAACC CGAAAGAACT ACTTGACTTG GTACCAGCAG
901 AAACCAGGGC AGTCTCCTAA ACCGCTGATC TACTGGGCAT CCACTAGGGA ATCTGGGGTC
961 CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGTGTG
1021 CAGGCTGAAG ACCTGGCAGA TTATTACTGC AAGCAATCTT ATAATCTTCG GACGTTCCGT
1081 GGAGGCACCA AGCTGGAAAT TAAACGGGCT GATCCTCCAG TATECATCTT CCAACCATCC
1141 AGTGAGCAGT TAACATCTGG ATCTGGAGGT GCCTCAGTCC TCTGCTTCTT GAACAACCTC
1201 TACCCCAAAG ACATCAATGT CAAGTGGAAG ATTGATGGCA GTGAACCACA AAATCCGCTC
1261 CTGAACACTT GCACTGATCA GGACAGCAAA GACAGCACCT ACAGCATGAG CAGCACCTTC
1321 ACGTTGACCA AGGACGAGTA TCAACCACAT AACAGCTATA CCTCTGAGCC CACTCACAAG
1381 ACATCAACTT CACCCATTGT CAAGACCTTC AACAGCGgag AGTGTgaggc cgcagattal
1441  aaa
```

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

1. Target Affinity Polypeptide -- it is -- a -- Stable Core Polypeptide Field (SCR) B -- at Least One Target Joint Field (TBR) ** is provided. Said target joint field is a polypeptide which has received the mature process in arbitration in order to have combined with the covalent-bond object at said SCR and to change the singularity, compatibility, or avidity to a target.
2. Polypeptide which is polypeptide according to claim 1, can carry out self-association and can form stable dimer, floc, or array.
3. Polypeptide with which it is polypeptide according to claim 1 or 2, and said SCR and TBR are combined by linker component.
4. Polypeptide which is polypeptide given in any 1 term of claims 1-3, and is two functionality or polyfunctional.
5. Polypeptide which it is polypeptide given in any 1 term of claims 1-4, and said SCR is the Homo sapiens origin, and is protein of type which exists in blood serum or is expressed by cell surface.
6. Polypeptide combinable with target chosen from group to which it is polypeptide of publication and said TBR becomes any 1 term of claims 1-5 from member of glycophorin or other erythrocyte cell surface proteins, influenza virus neuraminidase, viral antigen, antibody, or other IgG families, tumor growth factor alpha (TGF-alpha), tumor marker, cell surface protein, and leukemia inhibitor (LIF).
7. Polypeptide which has homology to immunoglobulin super family which is target affinity polypeptide of publication and includes combination of qualification antibody or antibody fragment, scFv fragmentation, qualification CD8 molecule and antibody molecule, or its fragmentation and CD8 in any 1 term of claims 1-6.
8. DNA structure which carries out code of target affinity polypeptide of publication to any 1 term of claims 1-7.

9. Approach possessing obtaining subpopulation of DNA which carries out code of target affinity polypeptide which presented mutation and one or more cycles of sorting with DNA which is approach of manufacturing DNA structure which carries out code of target affinity polypeptide of publication, and carries out target affinity polypeptide code to any 1 term of claims 1-7, and had property of changed compatibility, singularity, or avidity.
10. How to exist in the element with which it is an approach according to claim 9, and said DNA which carries out the code of the target affinity polypeptide has the capacity of a duplicate, or an expression vector.
11. The approach which is an approach according to claim 10 and is chosen from the group which said expression vector becomes from a bacteriophage, a fibrous bacteriophage, a virus, bacteria, yeast, slime mold, or a mammals cell.
12. The approach it hits by the approach according to claim 10, and said expression vector is pHFA.
13. The approach by which it is an approach according to claim 12, and mutation is performed using the mutant of Escherichia coli.
14. It is Approach of Manufacturing Target Affinity Polypeptide of Publication in Any 1 Term of Claims 1-7. a -- DNA which carries out the code of the framework structure of the target affinity polypeptide of one or more requests with the process isolated by the polymerase chain reaction Process which inserts b this DNA in one or more expression vectors The subpopulation of the expression vector expressing the target affinity polypeptide of the singularity of c request, avidity, or compatibility is sorted out, d alteration in order to obtain the subpopulation of the expression vector expressing the target affinity polypeptide which has the property of the compatibility carried out, singularity, or avidity The process which presents mutagenesis and one or more cycles of sorting with said this subpopulation sorted out, e alteration The process which inserts DNA which carries out the code of the target affinity polypeptide carried out in a high-level expression vector, process which introduces the high-level expression vector of f above into a suitable manifestation host g -- process which makes said target affinity protein discover h -- approach possessing the process which isolates the protein produced in this way.
14. The drugs constituent containing a target affinity polypeptide given in any 1 term of claims 1-7, and the support which may be permitted pharmacologically.
15. The diagnostic reagent which contains the target affinity polypeptide and dilution agent of a publication in any 1 term of claims 1-7.
16. The activity in a diagnosis of a target affinity polypeptide given in any 1 term of claims 1-7.
17. The activity as a remedy of a target affinity polypeptide given in any 1 term of claims 1-7.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504320

(43) 公表日 平成8年(1996)5月14日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 38/00	A B B		
39/395	A	9284-4C	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		9455-4C	A 6 1 K 37/02
			Z N A A
			A B B
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-508515
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)9月24日
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)3月27日
(86) 国際出願番号	P C T / A U 9 3 / 0 0 4 9 1
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 0 7 9 2 1
(87) 国際公開日	平成6年(1994)4月14日
(31) 優先権主張番号	P L 4 9 7 3
(32) 優先日	1992年9月25日
(33) 優先権主張国	オーストラリア (A U)

(71) 出願人	コモンウェルス・サイエンティフィック・ アンド・インダストリアル・リサーチ・オ ーガニゼーション オーストラリア国、エーシーティー 2600、キャンベル、ライムストーン・アベ ニュー (番地なし)
(72) 発明者	ハドソン、ピーター・ジョン オーストラリア国、ビクトリア州 3111、 ドンバール、カベナ・ストリート 6
(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的結合性ポリペプチド

(57) 【要約】

a) 安定なコアポリペプチド領域 (S C R) と; b) 少なくとも一つの標的結合領域 (T B R) とを具備する標的結合ポリペプチドであって、前記標的結合領域は、前記 S C R に共有結合体に結合しており、また標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを受けているポリペプチド。該ポリペプチドは、自己会合して安定な二量体、凝集体またはアレイを形成し得る。本発明のポリペプチドは、製薬産業およびヘルスケア産業における診断、治療、予診または予防の分野での有用性を有し、並びに化学物質の検出および分析におけるより一般的な用途での有用性を有している。

【特許請求の範囲】

1. 標的結合性ポリペプチドであって、
 - a) 安定なコアポリペプチド領域 (SCR) と、
 - b) 少なくとも一つの標的結合領域 (TBR)

とを具備し、

前記標的結合領域は、前記SCRに共有結合体に結合しており、また標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを受けているポリペプチド。

2. 請求項1に記載のポリペプチドであって、自己会合して安定な二量体、凝集体またはアレイを形成することができるポリペプチド。

3. 請求項1または2に記載のポリペプチドであって、前記SCRおよびTBRがリンカー成分によって結合されているポリペプチド。

4. 請求項1～3の何れか1項に記載のポリペプチドであって、二官能性または多官能性であるポリペプチド。

5. 請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記SCRがヒト起源であり、また血清中に存在するか若しくは細胞表面に表現されるタイプのタンパクであるポリペプチド。

6. 請求項1～5の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記TBRが、グリコホリンもしくは他の赤血球細胞表面タンパク、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ、

ウイルス抗原、抗体もしくは他のIgGファミリーのメンバー、腫瘍増殖因子 α (TGF- α)、腫瘍マーカー、細胞表面タンパクおよび白血病阻害因子 (LIF) からなる群から選択される標的に結合することができるポリペプチド。

7. 請求項1～6の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドであって、修飾抗体もしくは抗体フラグメント、scFvフラグメント、修飾CD8分子、および抗体分子もしくはそのフラグメントとCD8との組合せを含む、免疫グロブリンスーパーファミリーに対して相同性を有するポリペプチド。

8. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードする

DNA構築物。

9. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を製造する方法であって、標的結合性ポリペプチドコードするDNAを、突然変異および選別の一以上のサイクルに供して、改変された親和性、特異性または結合活性の特性をもった標的結合性ポリペプチドをコードするDNAのサブポピュレーションを得ることを具備した方法。

10. 請求項9に記載の方法であって、標的結合性ポリペプチドをコードする前記DNAが、複製の能力のある要素または表現ベクター内に存在する方法。

11. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターが、バクテリオファージ、繊維状バクテリオファージ、ウイルス、バクテリア、酵母、粘菌、または哺乳類細胞からな

る群から選択される方法。

12. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターがpHFAである方法。

13. 請求項12に記載の方法であって、突然変異が大腸菌の突然変異株を用いて行なわれる方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドを製造する方法であって、

a) 一以上の所望の標的結合性ポリペプチドのフレームワーク構造をコードするDNAを、ポリメラーゼチェーン反応によって単離する工程と、

b) 該DNAを一以上の表現ベクターに挿入する工程と、

c) 所望の特異性、結合活性または親和性の標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを選別することと、

d) 改変された親和性、特異性または結合活性の特性を有する標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを得るために、前記該選別されたサブポピュレーションを、突然変異誘発および選別の一以上のサイクルに供する工程と、

e) 改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、高レベル発現

ベクターに挿入する工程と、

f) 上記の高レベル発現ベクターを適切な発現宿主中に導入する工程と、

g) 前記標的結合性タンパクを発現させる工程と、

h) こうして産生されたタンパクを単離する工程とを具備

した方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、薬学的に許容され得る担体とを含有する薬剤組成物。

15. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、稀釈剤とを含有する診断試薬。

16. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの診断における使用。

17. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの医薬としての使用。

【発明の詳細な説明】

標的結合性ポリペプチド

【発明の技術分野】

本発明は、ハプテンおよび抗原に対する結合活性もしくは特異性を向上または改良した、新規ポリペプチドの構築、応用および製造に関する。

本発明はまた、表面提示抗原成分ライブラリーまたはハプテン結合成分ライブラリーの発現から誘導される抗体様の組換分子の構築、改良および選別、並びにこれらの分子の使用に関する。

本発明のポリペプチドは、製薬産業およびヘルスケア産業における診断、治療、予診または予防の分野での有用性を有し、並びに化学物質の検出および分析におけるより一般的な用途での有用性を有している。

【発明の背景】

抗体は、標的抗原またはハプテンに対する結合親和性をもったタンパク分子である。結合性相互作用の特異性によって、抗体は診断薬および治療用試薬として使用される。モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞のような純粋細胞系から誘導される。しかし、ハイブリドーマ技術は費用が高く、維持に時間を要し、また範囲が限定されている。全範囲の抗原に対して、モノクローナル抗体（適切な親和性をもった極めて少ない抗体）を生産することは不可能である。抗体遺伝子またはそのフラグメントはクローン化することができ、また大

腸菌（*E. coli*）内で生物学的に機能する形態で発現させることができる。抗体および抗体フラグメントはまた、バクテリア細胞または哺乳類細胞の何れかをを用いた組換DNA技術によって製造することができる。抗体のFab領域には、二つの重鎖および軽鎖の組合せによって、分子の先端に6つの可変表面ループが与えられる。これらの外部ドメイン（Fv）に存在するループは相補性決定領域（CDRs）と呼称され、その標的抗原に対する抗体結合特異性を与える。この結合作用は抗体分子の可変ドメインに局在しており、該ドメインは重鎖および軽鎖の両方のアミノ末端に位置している。これは図1に示されている。幾つかの抗体における可変領域は、本来の抗体分子からタンパク加水分解によって切断さ

れた後でさえも、非共有結合的に会合した状態 ($V_H V_L$ ダイマー、 F_v 領域と称する) で残り、その抗原認識能および結合能の大半を保持している。定常領域が実質的に存在しない二本鎖 F_v を製造する方法は、米国特許第4,642,334号に開示されている。

組換え F_v 断片は解離し易い。従って、幾人かの研究者等は2つのドメインを共有結合させて、 $s c F_v$ と称する構築物を形成することを選択した。該 $s c F_v$ においては、結合ドメインを有する2つのペプチド (通常は抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域) が、抗原結合ドメインの相対的位置関係が元の抗体で見られる位置関係と一致するように、一方のドメインのC末端を他方のN末端に結びつけるリンカーペプチドによって結合されている (図1参照)。

米国特許第4,946,778および同第5,132,405号には、共有結合的に結合された F_v 断片の製造方法が開示されている。更に、二官能性試薬 (bifunctional agents) および多官能性試薬 (multifunctional agents) の製造によって、異種混合 (heterogeneity) が達成される (ヒューストン等の米国特許第5,091,513号およびランダー等による米国特許第4,816,397号)。

$s c F_v$ ライブラリーの構築は、例えば欧州特許出願第239400号および米国特許第4,946,778号に開示されている。しかし、 $s c F_v$ をのコードする単一のDNA分子のクローニングに内在する問題のために、単鎖 F_v ライブラリーは大きさに制限をうける。 V_H または F_{ab} ライブラリーのような非 $s c F_v$ ライブラリーも公知であり (Ladner 及び Guterman WO90/02809) あり、これは表面発現用のファージ系と共に使用される (Ladner et al., WO88/06630 及び Bonnert et al., WO92/01047)。

抗体治療に使用する場合、モノクローナル抗体 (通常はマウス由来) はヒトに投与すると抗原性反応を引き起こすので、先ず「ヒト化」されない限りは使用が制限される。抗体の可変ドメインは、抗原結合部位を形成する6つの超可変領域 (CDRs) を有する β シート構造のフレームワークからなっている。ヒト化は、結合親和性を与えるマウスの配列、特に CDR ループ配列を、ヒト可変ドメイン構造内に置換することからなっている。従って、該マウスの CDR ループ領域

は所望の抗原に対する結合親和性を与える。CDRsの移植

による組換抗体のヒト化は、Winter et al (EP-239400) に開示されている。

発現／組合せシステムを用いて多様な組換ヒト抗体を発現させることが、Mark et al, J. Mol. Biol. 1991 222, 581-597に記載されている。繊維状ファージの表面にペプチドおよびタンパクを発現させる方法における最近の新事実 (McCafferty et al, Nature 1991 348 552; Clackson et al, J. Mol. Biol., 1991 352 624-28) は、診断および治療法としてこれら試薬を選択し、改良し及び開発する能力を提供している。マウスおよびヒトの両方に起源をもつクローン化された重鎖および軽鎖遺伝子の発現、提示および対合を行なうための改良されたバクテリオファージゲノムを使用することが、Hoogenboom et al, Nucl. Acids Res., 19 4133-4137; Marks et al, 1991 op. cit. 及びBonnert et al, WPI Acc. No. 92-056862/07に記載されている。

受容体分子（その発現は、該受容体をコードする遺伝子ライブラリーが発現生物体中で発現した結果である）もまた、同じ方法で表現され得る (Lerner and Scorge, WO90/14430)。細胞表面タンパクと融合した単鎖抗体ドメインの細胞表面での発現については、Ladner et al WO/06630に開示されている。

親和性の成熟は、抗体の結合特異性、親和性または結合活性が改変される過程である。様々な実験技術が工夫されており、抗体フラグメントの全体またはCDRs等の選択された領域の何れかに、種々の突然変異ストラテジーを適用するこ

とによって、多様なアミノ酸配列が創造される。酵素の特異的活性を変化させる突然変異についても報告されている。当業者は、ランダム突然変異または部位指向性突然変異を達成するため、並びに所望の修飾を施された分子を選択するための、種々の方法を知るであろう。所謂「チェーンシャッフリング (chain shuffling)」技術、即ち、固定された相補的鎖（例えば軽鎖）について一つの鎖タイプ（例えば重鎖）のライブラリーの再組合せを行なうことによって、多様性を高め且つ特異的な抗体を選択する機構については、Kang et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991 88 4363-466; Hoogenboom et al, Nucl. Acid Res., 1991 19

4133-4137; Marks et al, Bio/Technology, 1992 10 779-783に記載されている。

。

抗体のVドメイン、フレームワークまたは定常領域の何れかの部分のマウス配列に対して、ヒトが反応する問題を克服するために、末梢血リンパ球を含む種々のヒト組織から、組換えヒト抗体遺伝子ライブラリーを構築することができる (WinterおよびMilstein Nature, 1991 349 293)。ヒト成人は既に抗原性刺激を受けているので、広範囲の抗原を認識する予め免疫感作された成人B細胞集団の能力は、生来のB細胞集団と比較して減少し、また抗体のmRNA分子の制限された集団に反映される。

従って、できる限り広い抗原結合能を得るために選択される組織の一つは胎児末梢血である。この退治末梢血は生れた状態のままであり、IgM抗体分子の比率が大人の血液よ

りも高い(約70%;なおIgGは30%)。従って、種々様々な抗原を結合できるように広範な成熟(進化)を予定した抗体ライブラリーを構築するための、理想的な遺伝子材料の供給源を提供する。

[発明の概要]

従って、本発明の範囲内には下記の事項が含まれる。

- 1) 標的に対して結合する新規な組換えポリペプチドの同定および構築。
- 2) このようなポリペプチド剤を、例えばそのDNAコード領域の突然変異を含む機構によって改変し、その性能を変えること。
- 3) 更に、サブコンポーネントの再組合わせにより、遺伝子レベルまたはタンパクレベルの何れかにおいて、これらのポリペプチド剤を変化させること。

第一の側面に従えば、本発明は、標的結合性ポリペプチドであって、

- a) 安定なコアポリペプチド領域(SCR)と、
- b) 少なくとも一つの標的結合領域(TBR)

とを具備し、

前記標的結合領域は、標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを経ているポリペプチドを提供する。

我々は、結合の特異性、親和性または結合活性が改変された本発明によるポリペプチドを、成熟工程の実施を必要とす

ることなく、設計および構築することができた。こえは、例えば免疫グロブリン(Ig)およびCD8を用いて行なわれた。

我々は、TBRがSCRに共有結合している一価の標的結合性ポリペプチドの構築を開示する。該SCRは、好ましくは、Igスーパーファミリーの共有結合した二つのIg様ドメイン(例えば抗体可変部ドメインまたはCD8ドメイン)の結合によって形成される。

我々はまた、分離または重複したTBRsをSCR上に形成することによって、多官能の標的結合性ポリペプチドが如何にして製造され得るかを示す。我々はまた、IgスーパーファミリーのメンバーのIg様ドメインをSCRsとして構築することができ、また非共有結合的に結合して二官能性および多官能性の標的結合性ポリペプチドを製造できることを示した。我々は、Ig様ドメインに共有結合することができ、それにより自己会合して好ましくは二官能性または多官能性の特異性を有する安定なダイマー、集合体またはアレイを形成するアミノ酸配列を、如何にしてデザインするかを開示する

標的結合性領域は標的分子に結合することができ、該標的分子は何れのタイプの化学物質でもよい。例えば、該標的は殺虫剤または薬物等の小分子、ステロイド等のホルモン、アミノ酸、ペプチドまたはポリペプチド；細菌性、ウイルス性、または細胞表面抗原等の抗原；抗体またはIgスーパーファミリーの他のメンバー；腫瘍マーカー、増殖因子等であり得

る。当業者は、容易に種々様々な目的の標的を選択することができるであろう。

本発明のポリペプチドが、イン・ビトロでの診断目的に使用される場合、コアポリペプチド領域は、適切なタンパクなら何でも良い。しかし、本発明のポリペプチドをイン・ビボ使用することを意図する場合には、該コアポリペプチド領域は非抗原性であることが好ましい。従って、血清中に存在し或いは細胞表面に出現する、一般に耐性のあるタイプの通常のヒトタンパクなら何れも適するである

う。通常の細胞表面タンパクの一定のドメインは可溶型で産生され、また本発明の方法によって、その親和性を向上または改変することができる。T細胞表面タンパクを本来の標的とするヒトタンパクの場合、その可溶性フラグメントは、特に移植に有用な有望な免疫調節治療試剤になる。これらフラグメントの多くは、イムノグロブリンのスーパーファミリーのタンパクとの相同性を有するであろう。

本発明の特に好ましい態様においては、標的は、グリコホリン (glycophorin)) または他の赤血球細胞表面タンパク、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ；B型肝炎抗原、HIVのgp40タンパク等のウイルス抗原；腫瘍マーカー、CD28およびCD4等の細胞表面タンパク；腫瘍増殖因子 α (TGF- α)、白血病阻害因子 (LIF) からなる群より選択される。診断および治療の何れの応用においても、標的結合領域が二以上の特異性をもっていれば特に有用である。標的結合ポリペプチドが、二以上の標的との親和性をもって

いることが特に好ましい。この親和性は、表面を分離し又は重複させて、二官能性または多官能性試薬を形成することによって提供される。二作用性または多作用性の試薬もまた、任意にリンカーポリペプチドを使用して、個々の標的結合性ポリペプチドを共有結合または非共有結合させることによって作成されと思われる。

第二の側面において、本発明は、上記の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を提供する。

第三の側面において、本発明は、本発明の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を製造する方法であって、標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、突然変異および選別からなる1以上のサイクルに供して、親和性、特異性または結合活性の特徴が改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNA分子のサブ集団を得ることを具備した方法を提供する。

好ましくは、標的結合性ポリペプチドをコードするDNAは、複製能力のある要素または表現ベクター (display vector)、即ち、適切な宿主中で自己複製するベクターの中に存在することが好ましい。該表現ベクターは、好ましくはバ

クテリオファージ、F d等の繊維状バクテリオファージ、ウイルス、細菌、酵母、粘菌、または哺乳類動物細胞からなる群から選択される。

突然変異誘発は、ランダムまたは部位指向的の何れであってもよく、当業者はこの工程を行なうために適した多くの方法を知ってであろう。標的結合性ポリペプチドの一以上の標

的結合領域が、突然変異に供される。

本発明に用いられる好ましい突然変異系では、mut Dおよびmut T 1と命名された大腸菌の特殊な突然変異株を利用する (R. Fowler et al, J. Bacteriol., 1986 167:130)。これら特別の突然変異株はファージでトランスフェクトでき、本発明の目的に特に有用である。

好ましい態様において、上記の標的結合性ポリペプチドを製造する方法は、

- a) 一以上の所望の標的結合性ポリペプチドのフレームワーク構造をコードするDNAを、ポリメラーゼチェーン反応によって単離する工程と、
- b) 標的結合性ポリペプチドの一以上の標的結合領域に突然変異を誘発するために、該DNAを任意に突然変異誘発に供する工程と、
- c) 該DNAを、一以上の表現ベクターに挿入する工程と、
- d) 所望の特異性、結合活性または親和性をもった標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブ集団を選別する工程と、
- e) 該選別されたサブ集団を、親和性、特異性または結合活性の特徴が改変された標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブ集団を得るために、突然変異誘発および選別からなる1以上のサイクルに供する工程と、
- f) 改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、高レベル発現ベクターに挿入する工程とを具備する。

表現ベクターのサブ集団の選択は、標的結合、蛍光活性化

細胞選別、又はビオチン・アビジン若しくはビオチン・ストレプトアビジン系の利用等のような、種々の従来法によって達成される。特に好ましい方法は、免疫チューブ等の不溶性支持体上で行なう親和性選択である。これは特に簡便である

ことが分かった。

従って、本発明はまた、上記記載の高度の発現ベクターを適当な発現ホスト中に移入し、標的結合ポリペプチドを発現させ、こうして産生されたタンパクを単離することによって、標的結合性ポリペプチドを製造する方法をも提供することが理解されるであろう。

また、標的結合性領域および安定なコアポリペプチドは、同一分子の異なる領域であってもよく、または異なる分子から誘導されてもよいことが明瞭に理解されるであろう。

本発明によって観念される標的結合性ポリペプチド構築物のタイプには、改変された抗体または抗体フラグメント、連続的な際組合せを可能にする会合リンクを含んだ s c F v フラグメント、改変 C D 8 分子（例えば、単鎖 C D 8）、および抗体分子またはそのフラグメントと C D 8 または免疫グロブリン・スーパーファミリーに関連する他の分子（MHC クラス I および I I 分子のこのドメイン等）との組合せが含まれる。例えば、MHC クラス I の $\alpha 3$ ドメインは C D 8 と結合し、従って $\alpha 3$ の可溶性バージョンは有力な免疫調節剤になる。C D 8 を利用する好ましい構築物には下記のものが含まれる。

a) α および β サブユニットの V 様ドメインのみが連結さ

れている単鎖分子。

b) シグナルペプチドの電荷バランスを変更して、生物学的活性に悪影響を与えずにバクテリアでの発現を可能にするために、N 末端アミノ酸をリジンからセリンに変えた分子。

標的結合性ポリペプチドは、共有結合したポリペプチド尾部を含むことができ、該尾部は T B R s であってもよく、或いは他の T B R s と非共有結合的に会合していてもよい。

以下の記載は、特に I g G タイプの抗体およびそのフラグメントに関する幾つかの例に言及しているが、本発明は他のタイプ（I g M および I g A 等）の抗体にも応用可能であることは明確に理解されるであろう。

標的結合性ポリペプチドをコードする D N A 配列は、該ポリペプチドをバクテ

リアファージまたは細胞表面に表現できる何れのベクターにもクローン化できる。好ましいベクターはpHFAであり、その構築物は国際特許出願第PCT/AU93/00228に記載されており、その構造は図4に示されている。タンパクの発現に好ましい細菌ホストは、大腸菌 (*E. coli*) およびバチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) である。

〔図面の詳細な説明〕

以下の限定的でない実施例および図面を参照して、本発明を詳細に説明する。

図1は、抗体およびそのフラグメントの構造を例示している。

(a) これは、二つの同じ重鎖および二つの同じ軽鎖からなり、重鎖および軽鎖の夫々が可変ドメイン (V) と定常ドメイン (C) とに分かれている、典型的なIgG抗体のポリペプチド鎖構造を示している。全体のIgG分子は、Fv領域の末端に二つの同一の抗原結合表面を有しており、これら抗原結合表面はV_H鎖およびV_L鎖の対合によって形成される。このV_HおよびV_Lの組合せによって、相補性決定領域 (CDRs) と称する6個のループが分子の先端に提供され、これらループは抗原結合表面を提供することによって、その標的抗原に対する抗体の結合特異性を与える。

(b) Fab抗体フラグメントは、一つの軽鎖および一つの重鎖の一部を含んでいる。

(c) FabフラグメントおよびFvフラグメントの両者は、何れも親抗体と同じ抗原結合表面を有していると思われる。

図2は、繊維状Fdバクテリオファージの表面に、該ファージ先端の副次的コートタンパク (遺伝子IIIタンパク) に対する共有結合的な融合によって、或いは主要な遺伝子VIIIコートタンパクとの融合として表現された、Fab分子およびscFv分子のような抗体フラグメントを示している。Fab

分子の表現については、一方の鎖 (重鎖又は軽鎖) のみがファージのコートタンパクにアンカーされ、他方の鎖は可溶性で宿主細胞の周辺細胞質中に可溶性の形で与えられる。遺伝子IIIタンパク上での融合によって宿主細胞への感染性

が低下しているが、このF dバクテリオファージは未だ生存可能である。

図3は、重鎖領域および軽鎖可変領域のプール（ライブラリー）が、一方の鎖をファージの遺伝子IIIタンパクまたは遺伝子VIIIタンパクに融合させて、F dファージ表現ベクター中に構築される方法を示している。この表現ベクターは宿主細胞中にトランスフェクトされて、二重組合せライブラリーを生成する。夫々の宿主細胞は、抗体フラグメントがファージ表面に表現される生存可能なF dファージを製造し、また抗体をコードする遺伝子はウイルスゲノムと共にパッケージされる。ファージのアフィニティー精製は標的抗原に対する親和性に基づいており、抗体をコードする遺伝子の生存ファージからの同時回収を可能にする。ファジミド表現ベクターは形質転換収率を改善することができるが、生存可能な子孫を組み立てるためのヘルパーファージを必要とする。別の戦略には階層的ライブラリーの構築が含まれるが、ここでは一定に維持された一方の鎖が第二の鎖のライブラリーと共に表現され、親和性の最も高い対合鎖が選別される。別の表現ベクター上の遺伝子プールを用いてより複雑なライブラリーを構築することができ、次いで該ライブラリーは宿主細胞に交差トランスフェクトされる。遺伝子の回収は、

この二つのベクターの相対的なパッキング効率に依存するであろう。

図4は、ファジミドベクターHFAの構造を示している。該ベクターは、大腸菌(E.coli)の抑制株において、F dファージ表面の遺伝子IIIタンパクと融合されたクローン化抗体を発現する能力を有する一方、非抑制株においては、該クローン化抗体遺伝子は可溶性生成物として発現される。lacZプロモータは、IPTGでの発現の誘導を可能とし、またFLAG（抗体との融合体として発現される）は合成の検出およびアフィニティー精製のために用いられる。

図5は、一連のscFV・NC10欠損リンカー構築物と、ポリペプチドリンカーによって連結される理論的な最小距離（オングストローム）とを示している。

図6は、適切に制限分解されたpPOW-scFV・NC10の中に挿入された、長さが異なるポリペプチドリンカーをコードする合成オリゴヌクレオチド二

重鎖のDNA配列を示している。

図7は、 $V_H \cdot 15 \cdot V_L$ 、 $V_H \cdot 10 \cdot V_L$ 、 $V_H \cdot 5 \cdot V_L$ および $V_H \cdot V_L$ から合成されたscFV・NC10タンパクの分析を示している。図の写真は、クーマシーゲル（上部パネル）上での非誘導型（レーン1～4）および誘導型（レーン5～8）の分析結果と、抗FLAG、M2抗体（IBI社、New Haven、CT）でプローブされ、続いて第二抗体としてのヤギ抗マウス抗体・西洋ワサビペーオキシダーゼ複合体（シグマ社）で処理され、更に増強化学発光（ア

マーシャム社）によって検出された該クーマシーゲルのウエスタンブロットの分析結果（レーン9～16下部パネル）である。

図8は、観察されたscFV・NC10の会合度と、その標的抗原に対する活性の要約である。

図9は、抗体Fvフラグメントと、CD8 α 鎖ヘテロ二量体との間の構造の同一性を示している。

(a) これは、1～6の番号を付したCDRループおよび構造的に保存されたフレームワーク領域（リボン）を示す、 V_H または V_L 分子のリボン図である。

(b) これは、二つのCD8 α 鎖のリボン図である。抗体CDRループに対応する領域は分子の頂部に示され、番号が付されている。

このホモ二量体は、紙面に垂直位置する分子対軸をもって配向されている。分子の頂面からのCVR様ループが示されており、CDR1様ループ、CDR2様ループおよびCDR3様ループには、一方のサブユニットについては夫々1，2および3の番号を付し、他方のサブユニットについては夫々1'，2'および3'の番号を付してある。C末端は分子の底部から延出している。二量体界面を形成するループは、CDR3様ループ（頂部）およびC-C'ループ（底部）である。

図10は、pPOWを用いて大腸菌宿主細胞popp²¹³⁶中で合成されたscCD8の、全細胞様怪物を示すクーマシーで染色したSDS-PAGEゲルを示している。矢印は、

融合および成熟（開裂したシグナル配列）s c C D 8 の位置を示している。この図において、

レーン 1 : p P O W - s c C D 8 を含む非誘導細胞

レーン 2 : p P O W - s c C D 8 の 4 時間の後インキュベーション

レーン 3 : p P O W - L y s → S e r · s c C D 8 を含む非誘導細胞

レーン 4 : p P O W - L y s → S e r · s c C D 8 の 4

時間の後インキュベーション

レーン 5 : 前染色された分子量マーカーである。

図 1 1 は、個々の抗体遺伝子がアフィニティー成熟され得るスキームを示している。個々の遺伝子はファージ表現ライブラリーから選別され、次いで数ラウンドのイン・ビボ突然変異またはイン・ビトロ突然変異を受ける。アフィニティー成熟した抗体フラグメントは、次いで、更なる突然変異ラウンドまたは高レベル遺伝子発現に先立って、抗原に結合する能力について選別される。全体の抗体ライブラリーは、パンニングまたはアフィニティー選別による個々のファージの選別に先立って、突然変異ラウンドを繰り返すことにより、その複合度を増大させることができる。

図 1 2 は、アフィニティー突然変異のための突然変異を受けたコロニーの、E L I S A スクリーニングの結果を示している。

図 1 3 は、p 5 6 9 ベクター (W. Nellen 氏からの供与)、

即ち、D. ディスコイデウム (D. discoideum) 内での発現のためのシャトルベクターの一例を示している。このベクターは、アルファ L フコシダーゼプロモーター配列、シグナル配列、マルチクローニング部位、翻訳ターミネータおよび G 41 8 による選別のためのトランスポゾン T n⁹⁰³ を有している。

図 1 4 は、X 線回折分析によって 3 オングストロームの解像度で解析された、二つのインフルエンザノイラミニダーゼ・サブユニットと複合された N C 1 0 · s c F v フラグメントのポリペプチド骨格として描かれた三次元構造を示している。この図では、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を連結しているリンカーポリペプチドは描かれていない。この結晶構造においては、二つの F v フラグメント

が背面-背面で会合して、二つの異なるノイラミニダーゼサブユニットを二量体化している。この s c F v フラグメントの状況において、該二量体 F v 分子は二官能性試薬とみなされる。

図 15 は、溶液中において電子顕微鏡によって解析された、四つの NC 10・s c F v 二量体によって一緒に結合された二つのノイラミニダーゼ四量体のモデルを示している。

図 16 は、背面-背面で二量体化され、立体障害なしに密接に会合された二官能性 F v 分子のモデルを示している。このモデルにおいて、重鎖の C 末端は、残りのポリペプチド骨格の最小限の再構成を伴って、軽鎖可変領域の -13 残基に直接に連結され得る。

図 17 は、非共有結合的および共有結合的に夫々連結された s c F v 二量体を模式的に示している。

配列認識番号 1 は、バクテリアでの発現のためにデザインされたマウス L y - 2⁺ L y - 3 V ドメインの一例を示している。

配列認識番号 2 は、p P O W のようなバクテリア分泌型ベクター中での発現のためにデザインされた、ヒト単鎖 C D 8 構築物の一例を示している。

配列認識番号 3 は、発現のためにデザインされたマウス M H C a 3 ドメインの一例を示している。

配列認識番号 4 は、p H F A におけるリンカーを含まない 1 C 3・s c F v の DNA 配列を示している。

配列認識番号 5 は、p e l B 分泌シグナルおよび F L A G・C 末端ペプチドを伴った、抗インフルエンザ NC 10・s c F v の DNA 配列を示している。

配列認識番号 6 は、P C R 増幅後の p⁵⁶⁹への連結のために準備された p H F A における抗グリコホリン 1 C 3 F a b の最初の 1443 塩基の DNA 配列を示している。

本発明の好ましい態様には、次のものが含まれる。

1. 標的結合性ポリペプチドの構造は、抗原に対する接触領域（従って特異性）を提供する表面ポリペプチドの 6 個のループによって一つの T B R が形成され

るような、s c F v分子に基づき得る。特に好ましい態様においては、抗原に接触して十分な接触面積および親和性を与えるために、T B Rは4個のC D Rループによって形成され得る(図14)。N C 10を用いた我々の結果は、これらポリペプチド配列をランダムに突然変異して標的親和性を修飾することが容易であることを示している。

2. 二官能性または多官能性の抗体試薬は、個々の標的結合性ポリペプチドを共有結合的に連結することによって製造することができる。この共有結合的結合は、単鎖F v分子の形のポリペプチド鎖によって提供され得る。二量体化または凝集し易い傾向をもった個々のタンパク、領域を結合することによって、特異性を組合せることができる。従って、例えば、追加のポリペプチド鎖によって、二つの単鎖F vフラグメントをその正常な向きで連結することは必要とされない。これは、異なった特異性の重鎖と軽鎖、重鎖と重鎖、または軽鎖と軽鎖を連結し、次いで機能的な二量体または凝集体を形成することによって達成することができる。勿論、この方法はまた、必要な特異性をもったVドメインを、C D 8、T細胞受容体フラグメントまたはM H Cフラグメントから誘導された免疫グロブリン様ドメインと連結するためにも用いることができる。

好ましい態様において、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のような二つのI g様ドメインの共有結合的な連結は、リンカーポリペプチドを用いて、または用いること無く行なうことができる。単量体s c F vフラグメントの場合、ポリペプチドリンカーは、s c F v結合部位の原形を損なうこと無く、一方の可変(V)ドメインのカルボキシ末端と他方のVドメインのアミノ末端との間で、V_HドメインおよびV_Lドメインを共有結合的に連結する。s c F vは、V_H・リンカー・V_L融合タンパクの、若しくはV_L・リンカー・V_H

融合タンパクの何れかのドメイン順序で組み立てられ得る。このリンカーは、疎水性のVドメイン表面との会合を防止するために、好ましくは親水性でなければならない。リンカーは、経験的な選別によって確立された好ましい大きさをもった25アミノ酸残基よりも小さい長さであり得る。好ましいリンカー配列は5量

体ユニットのG l y 4 S e r からなり、ここでセリン残基はペプチド骨格の親水性を高める一方、グリシン残基は、Vドメンの回りに或る範囲のコンホメーションを取るために十分な可撓性をリンカーに与える。特に好ましい態様において、ポリマーF v フラグメントの共有結合性の会合体は、連結配列において一つのI g ドメインの切片を除去することによって、追加のリンカーポリペプチドなしで製造することができる。これらのリンカー無しの構築物は、ここでは緊密に結合されたドメイン (tightly coupled domains ; T C D s) と称する。除去すべきアミノ酸の数は経験的に、或いはタンパク設計理論を用いて決定することができる。図16は、二つのF v 分子が背面-背面で会合したT C D s を描写しており、ここでは二つのT B R s が分子の反対端にあり、二つの標的分子に交差結合することができる二官能性試薬を形成している。この例においては、密接な会合を得るために、好ましくは13アミノ酸までが除去される。得られた分子は、近接してはいるがI g 様ドメイン間の相互作用が立体的に阻害されないような形で、少なくとも二量体にまでオリゴマー化する傾向を有している。遊離のアミノ末端およびカルボキシ末端にポリペプチド尾部を付加することに

よって、分子上のT B R s の数を増加できると思われる。また、I g 様ドメインの結合部で除去された欠失ポリペプチド配列が、I g 様ドメインにおける他の位置に結合したポリペプチド配列を与えることによって、全体的または部分的に置換され得ることは明らかである。我々は、これら分子が二次元アレイを形成し、それによって二官能性表面を提供することができるであろうと予期してゐる。これらのアレイは、生物学的なコーティング手段としての特異的な用途を有するであろうと思われる。

ヘテロ二量体的な α 鎖および β 鎖を含む、成熟したヒト若しくはマウスC D 8 の完全な三次元構造は未だ知られていない。ヘテロ二量体ヒトC D 8 α の結晶構造からの予測は、 α 鎖がトポロジーにおいて抗体V_L鎖と類似していることを示唆している (Leahy et al., Cell, 1992, 68, 1145-1162)。我々は、バクテリア選別バクターを用いた発現のために、マウスC D 8 α / β ヘテロ二量体の単鎖変種を構築したが、ヒトC D 8 を用いても同様の結果が期待され得る。本来のヒ

ト若しくはマウスのCD8分子は、MHCクラスIの分子にのみ親和性を有すると思われる。我々は、実施例に記載したようなランダムライブラリーのアプローチによって、scCD8分子を、標的結合性ポリペプチドを製造するための安定なフレームワークとして用いることが可能になるであろうことを予測した。この方法によって、scCD8分子を疑似抗体として使用することができる。更に、このscCD8分子は、接触表面に6個未満のCDRループのためのフレームワーク

を提供するために、大きさ及びCDRと等価なループ構造を更に修飾することができる。特に好ましい態様において、我々は、接触領域に4個または5個のCDRループを提供できる安定なタンパクフレームワークを企画している。我々はまた、他のIgドメインに適用するための戦略を企画している。例えば、MHCクラスIおよびIIの免疫グロブリン様ドメインを可溶性の形で発現させることができ、これを修飾すれば免疫調節剤として使用することができる。

4. 標的結合性ポリペプチドに対する上記のような修飾は、図3に示したようなライブラリー選別および修飾戦略を用いることによる、コーディング領域の突然変異に基づくことができる。この突然変異は、低親和性で且つ特異性の広い単鎖TBPまたはTBPを成熟させ、それが認識する標的分子の範囲を高める。より重要なことは、ライブラリーの各メンバーについての結合親和性の範囲を作成し、その個々のDNAコーディング領域が公知の方法論によって容易に選別され、単離され得ることである。このようなライブラリーは、抗体様フラグメントに対して親和性を示し、或いはリガンド、他のタンパク、酵素若しくは受容体に対して親和性を示す何れか別のペプチドを含むであろうことが想定される。また、それ自身は抗原性ではないが、組換えDNA技術によってコーディング領域を移植することにより、特定のリガンドに対する親和性をもったCDRループまたはペプチドを付加することによって修飾され得る安定なコアポリペプチドをも含み得る。また、フレームワーク領域に対する変化によっ

て、タンパクのコンホメーションの変化がもたらされ、親分子とは異なった結合

特性をもった変化した結合表面が提示されることも見られる。

最も平凡な例には、所定の標的結合特性をもった組換え抗体フラグメント（単鎖F_vフラグメントを含む）を製造する発現ライブラリーの構築が含まれる。図3に示した夫々の選別工程に引き続き、結合ドメイン（好ましい例ではV_HドメインおよびV_Lドメインを含む）の継続的な再組合せを可能にする表現ベクターは、例えばpHFAのために適切に使用することができる。

5. 本発明は、広範囲の受容体、受容体様分子、並びに結合活性、構造的・一体的および生物学的活性の何れにとっても潜在的に重要な領域における突然変異を伴って構築された分子を構築し、選別するために使用され得る。発現した後の初期のファージ表面での表現、および大腸菌からのファージ救出は、このアプローチの有効性をモニターするために用いられるが、真核細胞系のような他のシステムも発現能力を有している。酵母（サッカロマイセス・セレビシアエ）は、 α 交配因子プロモータの制御下において、NC41のV_H、即ちインフルエンザウイルスのスノイラミニダーゼに対するモノクローナル抗体を発現することが示されており、また粘菌のディクチオステリウム・ディスコイデウム (*dictyostelium discoideum*) はNC10のV_HおよびscF_vの両方を含む組換えタンパクを発現することができる。

6. 特定の抗原（LIF, TGF- α 、グリコホリン、細

胞表面マーカーまたは他の細胞特異的タンパクが含まれ得る）に結合することができる標的結合性ポリペプチドの特異的な選別は、表現ベクター上での表現、例えば遺伝子III生成物に融合したこれらペプチドのファージ表面での表現の結果として可能になる。適切なファージを選択することによって、これらは次に、図5に示したように突然変異のラウンドに供される。

以下の実施例においては、分子の全体に亘ってランダムに突然変異を誘発するために、大腸菌のmutDおよびmutT1変異株が用いられる。これは、文献に見られる何れかの標準的な技術を用いることにより、これら的大腸菌株をプラスミドDNAで形質転換することによって行なわれる。好ましい方法は電気穿孔法である。或いは、標準的なトランスフェクション法によって、組換えファージ

を変異株にトランスフェクトしてもよい。これらのプラスミド／ファージを含む大腸菌の増殖ランドを行なった後、ファージは、ヘルパーファージを用いた標準的な技術によって救出され得る。次いで、結合親和性に対する種々の突然変異の影響を測定するための、抗原結合試験に用いることができる。

これらの突然変異は、DNAにおける塩基置換を起こすことは確認されていないけれども、分子における結合領域の数、大きさおよび位置が変わるような、分子の構造に対するペプチドの付加も含まれ得る。これらの付加を伴う単一のドメイン結合ユニットは、特異的でないとすれば、親和性が実質的に変化した結合特性を示すであろう。特定の部位における

突然変異と結合親和性との間の相関は、治療的および診断的に有力な標的結合性ポリペプチドのための、新しいCDRループおよびフレームワーク領域をデザインするために用いることができる。

本発明の範囲にはまた、「抗体遺伝子」の制御された発現に向かうプロセスの第一ステップの原因でとなる抗原または何らかのリガンドの直接の制御下での、組換え細胞からの組換えタンパクの発現も包含される。

7. 二官能性または多官能性試薬は、上記のライブラリー技術を用いて選別することができる。標的結合性ポリペプチドは、ポリペプチド尾部を介しての結合によるアフィニティー選別のために表現され得る。二以上の異なった標的抗原もしくはハプテンに対する親和性に基づく選別は、同じ分子の異なった位置に二つの結合表面を有する単一の分子を選別するであろう。これらの結合表面は重なり得る。二官能性または多官能性の試薬を選別するためのライブラリーを構築するために、タンパク分子の二以上の表面に適用される部位特異的突然変異およびランダム突然変異のストラテジーが用いられ得る。単鎖F_vまたは単鎖CD8の場合、突然変異のために好ましい領域は、CDRループと、s c F_v分子の他端にある反対のカウンターパートであろう。F a b分子の場合には、好ましい突然変異はCDRループと、定常ドメインの他端にある反対のカウンターパートループにおけるものであろう。

外に特記しない限り、ここで言及される全ての標準法は、

Sambrook et al., 1990の「分子クローニング - A実験室マニュアル」に記載されている。

実施例1 異なる長さのポリペプチドリンカーを用いた
単鎖Fvフラグメントとしての標的結合性ポ
リペプチドの構築および発現

NC10 (インフルエンザウイルスN9株上のノイラミニダーゼ (NA) 分子を認識するモノクローナル抗体) の親scFvフラグメントをデザインし、構築し、大腸菌中で発現させた (配列認識番号5)。アミノ末端の分泌シグナルPre1Bによって、合成タンパクは大腸菌のペリプラズムに導かれ、そこで不溶性膜フラクションと会合された。オクタペプチド (FLAG; IBI USA) の尾部を、該scFvのカルボキシル末端に融合させ、引き続き精製工程を通して該scFvをモニターするために用いた。この試剤は二官能性であり、ノイラミニダーゼおよび抗FLAG抗体の両者に対して特異性を有する。

このscFv・NC10タンパクは、大腸菌膜フラクションを塩酸グアニジウムで溶解し、続いてカラムクロマトグラフィーにかけることによって精製された。精製されたscFv・NC10のサイズ排除HPLCによって、scFvフラグメントは単量体 (27 kDa) および二量体 (54 kDa) の大きさに対応する二つのピークを生じることが示された。更に、単量体型はN9NAに結合して320 kDaの複合体を形成するのに対し、二量体型はN9NAに結合して640 kDaの複合体を形成した。320 kDaの複合体は、単一のNA分子に結合している4つのscFv分子から構成されるのに対し、640 kDa複合体は、二つのNA分子に

結合している4つのscFv分子から構成される。電子顕微鏡によって、2つのノイラミニダーゼ四量体が、四つの二官能性scFv二量体によって緊密に結合している事が確認された (図15)。NC10・MabのscFv構築物との間で複合を形成しているインフルエンザ・ノイラミニダーゼのアジサシN9 (鳥類) 株について、高解像度の電子顕微鏡観察を行なった。ここで、該分子複合体は

ホホタングステン酸カリウム (potassium phospho-tungstate) (pH 7.0)、または酢酸ウラニル (pH 4.0) によって染色 (コントラスト化) した。

同じN9Naの、モノクローナルFab (32/3、NC35およびNC41) との分子複合体および全モノクローナルIgGs (32/3、NC41およびNC10) との分子複合体を画像化した、我々が以前に行なった広範な実験に基づいて、我々は、N9Na-scFv複合体の画像を、4つの架橋scFv二量体によって面と面で結合したノイラミニダーゼの頭部対の閉じた構造であり、この結合は緊密に充填された分子複合体が4重の点対称を維持するように行なわれていると解析することができた (図15)。N9Na-scFv分子複合体のこの画像解析は、溶液中で観察された複合体の分子量、Mr 610,000とまさに一致している。

scFvがノイラミニダーゼと複合体を形成している結晶のX線回折 (図14) では、二重の回転軸によって関係づけられる二つのscFv分子の間に緊密な会合ある事が実証された。二つの可能な二量体構造が考えられる。最初の例にお

いては、ペプチド尾部を持つ単一のポリペプチド鎖によってコードされたV_HおよびV_Lドメインが二官能性のscFvを形成し、これが別のscFv分子と非共有結合的に会合する (図17)。二番目の例では、各Fvにおいて抗原結合表面 (TBR) を形成するV_HおよびV_Lドメインが、非共有結合的に会合しており、該二つのFvはリンカーポリペプチドによって共有結合している (図17)。

分子モデル作成研究 (図14) によって、非共有結合的に会合した二量体のV_HおよびV_Lドメイン間の距離は少なくとも35オングストロームであるのに対し、共有結合した二量体のV_HおよびV_Lドメイン間の距離は25オングストローム未満であろう事が示される。我々は、隣接するペプチド結合間の距離を3.8オングストロームとし、またリンカーが理論的に広がり得る距離を、残基が15、10、5および0のリンカーpPOW/scFv・NC10構築物について夫々54、36、18、および0オングストロームと仮定して、scFvタンパクが異なる長さのリンカーによって抗原と結合した場合に形成されるscFv-NaA複合体のタイプを調査した。

リンカーの長さを短縮した一連の s c F v · NC 1 0 タンパクを作成した (図 5)。最初の p P O W - s c F v · NC 1 0 構築物は、3つの5量体ユニット G l y 4 S e r からなるポリペプチドリンカーを有している (この p P O W - s c F v NC 1 0 構築物は15残基のリンカー、V_H 1 5 V_Lと称される)。これらの5量体ユニットの各々を順番に除去す

ることによってリンカー欠損突然変異体を構築し、2、1および0ユニットを有する構築物 (V_H 1 0 V_L) V_H 5 V_L、V_H V_Lの残基リンカー p P O W - s c F v · NC 1 0 構築物と称す) が形成された。更に、V_Hドメインのカルボキシル末端が直接V_Lドメイン (V_H-1 3 V_L) に結合されるように、V_Lドメインの第一β鎖 (最初の13アミノ酸) を欠損させることによって s c F v - NC 1 0 構築物が作成された。

リンカー長を短縮した p P O W - s c F v - NC 1 0 構築の詳細

p P O W - s c F v - NC 1 0 構築物は、B s t E I I (New England Biol abs社) および S a c I (Pharmacia社) を用いて、製造業者の仕様書に従って連続的に消化され、ポリペプチドリンカーが除去された。制限酵素消化されたリンカーの無い p P O W - s c F v · NC 1 0 DNAを、0.8%アガロースゲルから電気泳動溶出し、0.3M酢酸ナトリウムおよび2.5倍体積量のエタノールを用いた沈殿によって濃縮した。合成オリゴヌクレオチドは、0.5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Pharmacia社)、1 mM A T P、およびOne-Phor-Allバッファープラス (Pharmacia社) 中において37℃で30分間インキュベートすることにより、5'末端がリン酸化された。一対の相補的なリン酸化オリゴヌクレオチド・プライマー (図6) を予め等モル比で混合して、長さが増加した単鎖リンカーをコードするDNA二重体を形成した。これらの二重体を、アマーシャム社のライゲーション

キット (Amersham ligation kit) を用いて、B s t E I I - S a c I で制限分解された p P O W - s c F v · NC 1 0 プラスミド中に連結した。V_H-1 3 V_L 構築物を作成するには、若干異なったアプローチが必要とされた。欠損V_Lドメ

インに亘って広がるオリゴヌクレオチドプライマー (図6) を構築し、これをFLAG特異的なオリゴヌクレオチドプライマー (図6) と組合せて合わせて使用し、PCRによってscFv・NC10のV_H-13V_Lフラグメントを増幅した。この増幅物をBstEIIおよびEcoRIで消化し、同様に消化されたpPOW-scFv・NC10プラスミド中に、アマーシャム社製のライゲーションキット (Amersham ligation kit) を使用して連結した。この連結混合物を、等体積量のフェノール/クロロホルムで抽出精製し、0.3M酢酸ナトリウムおよび2.5倍体積量のエタノール中で沈殿させた。この連結DNAを20mlのH₂O中に再懸濁し、そのサンプル5mlを大腸菌DH5a (supE44, hsdR17, recA1, endA1, gryA96, thi-1, relA1) およびLE392 (supE44, supF58, hsdR14, lacY1, galK2, galT22, metB1, trpR55) 中に形質転換した。細胞を1mlのLB培地中で1時間振盪し、100mg/mlのアンピシリンを含む2xYT培地にプレートした。pPOWベクターのPelBリーダー配列およびFLAG配列に向けられたオリゴヌクレオチドを用いたPCRスクリーニングによって、組換えクローンを同定した。短縮されたリンカー領域のDNA

配列は、二本鎖DNAをシーケナーゼ (Sequenase) 2.0 (United States Biochemical社) を用いた配列決定によって確認された。

短縮リンカーを有するscFv・NC10タンパクのタンパク発現

形質転換されたLE392を、30℃のSB培地で一晚増殖させ、1:10に希釈して、新しいSB培地に接種した。培養物を30℃で振盪しながら、600nmでの吸光度 (A₆₀₀) が約4になるまで増殖させた。誘導期間 (A₆₀₀が7になるまで4時間続く) の残りの時間については、温度を42℃まで上昇させた。細胞を遠心分離機 (Beckman JA10、6,000rpm 15分) から回収し、上澄液分画を除去した。細胞ペレットを、元の体積の10%で、20%シュクロース、10mM Tris-HCl, pH7.5中に再懸濁し、氷上に5分放置した。EDTAを5mMの最終容積にまで添加し、該混合物を更に10分間だけ氷上でインキュベートし、前記のようにして遠心分離し、細胞をペレット化した。上澄液を捨て、細胞ペレットを水中に

再懸濁し、該混合物を再度遠心分離し、ペリプラズミックタンパクを含んでいる上澄液を除去した。こうして得られた細胞ペレットを水中に再懸濁し、超音波（大規模調製では30のバーストを6回、小規模調製では30秒のバーストを1回）により溶解させ、氷上に5分放置した。遠心分離の後、水相は溶解細胞室分画として回収され、またペレットは不溶性膜結合分画を含んでいた。scFv・NC10の発現を確認するために、個々のクローンからの全細胞溶解物を還元状態下

でのSDS-PAGE、並びに抗FLAGモノクローナル抗体M2（図7）を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。28、29、31及び32 kDaで移動する単一の陽性バンドが観察された（図7、レーン13-16）。これらの分子量は、pPOW-scFv・NC10構築物を残基数0、5、10および15のリンカーと夫々組合せて合成されたscFv・NC10-FLAG融合タンパクの予想分子量と相関していた。残基数0、5および10のリンカーを有するscFv・NC10タンパクは、15残基のリンカーを有するタンパクと同じ特徴を示した。scFv・NC10-FLAG融合タンパクは大腸菌の不溶解膜に結合しており、その約半分は、塩酸グアニジニウムで処理にすることによって可溶化することができた。

この可溶性生成物は、ゲル濾過、並びにMono-Q上または尾部に対して特異的な抗体を含む親和性マトリックス上でのクロマトグラフィーによって精製された。該精製物については、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー（SE-HPLC）、超遠心分離分析、親抗原（インフルエンザ・ノイラミダーゼ）に対する結合活性、抗原と本剤との間に形成された複合体の電子顕微鏡観察によって特徴付けが行なわれた。架橋実験によって、該生産物の大きさ確認された。その特性を図8に要約して示した。

実施例2 マウス及びヒトscCD8の構築

(Gly, Ser)₃リンカーをコードする追加のヌクレオチドを有するV様ドメイン（配列認識番号1）に対して

相同性のプライマー（入手可能なデータベース配列を用いた）及び用い、ベント

ポリメラーゼ (Vent polymerase) でのPCRによって、マウスCD8のV様ドメインのみを含む α 鎖および β 鎖を別々に増幅した。二つの別々のドメインをアニールした後、dNTPsおよびポリメラーゼを用いて該生成物を伸長させた。scCD8遺伝子は、3'末端にMscI部位および5'末端にSalI部位を含む新しいプライマーを用いて増幅された。この単鎖生成物はMscIおよびSalIで消化され、次いでMscIおよびSalIで消化したpPOWベクター中にクローン化された。大腸菌宿主細胞株であるpop2136中において、高レベルのタンパク合成が得られた。正しく開裂した生成物の合成を増大させるために、N末端の修飾がデザインされた。これは、マウスCD8 α 鎖のN末端残基をリジンからセリンに変えることによって達成された(ヒトCD8のN末端残基はセリンである)。大腸菌宿主細胞株pop2136(全細胞溶解物を示している)を用いたpPOW中のscCD8の合成は、図10に見ることができる。合成されたscCD8生成物は、コンホメーション的に正しい形のタンパクのみを認識する抗CD8抗体によって検出された。

ヒト・scCD8

成熟 α 鎖タンパクのV様ドメインをコードするDNAが、Taqポリメラーゼと、(Gly₄Ser)₃リンカーをコードする追加のヌクレオチドを有し且つ制限酵素部位MscIおよびBamHIを含むV様ドメイン(配列認識番号2)

に対して相同性のプライマー(入手可能なデータベース配列を用いた)とを用いたPCRによって増幅された。CD8 β 鎖のV様ドメインは、血液から単離されたDNAから、BamHIおよびEcoRI制限酵素部位を含むプライマーを用いたPCRによって直接増幅された。二つの個々の生成物は適切な酵素で消化され、次いでMscIおよびEcoRIで消化したpPOWベクター中に連結された。

各単鎖CD8構築物のDNA配列は、二本鎖DNAの配列決定によって確認された。このヌクレオチド配列は、配列認識番号1及び2に示されている。この例において、該ベクターは、診断用途および結合用途(アフィニティー精製を含む)のためのC末端ペプチド尾部を有するscCD8の合成を指令する。scCD

8 生成物の生物学的活性をモニターする好ましい技術には下記のものが含まれる。

(a) 例えばバイオセンサ技術を用いたタンパクの結合親和性の直接の測定、或いは、全細胞または β 2ミクログロブリン若しくはMHCクラスI分子の α 3ドメインのような細胞表面分子もしくはそのフラグメントに対する結合を用いた超遠心分離。

(b) C末端ペプチド尾部を診断マーカーに用いた、RMA-S細胞内で発現されたMHCクラスI分子（ペプチド付加された）に対する結合試験。

(c) 例えば、T細胞の活性化の際のIL2産生に対するペプチド依存性効果の変化をモニターするような機能阻害試験。

実施例3 リンカーを含まない抗グリコホリン1C3の構築

親IC3抗体およびscFv誘導体は、国際出願番号第PCT/AU93/00228号に開示されている。

オリゴヌクレオチドN2034

(5' -ACGTAGGTCACCGTCGCCTCCGACATCGTCATGTCACAGTCTCCATCCTCC-3')

は、何等の介在リンカーも含まずに1C3V_L5'配列の最初の30塩基に結合した、1C3V_Hの3'末端の最後の15塩基に対して相補性を有するように合成された。

オリゴヌクレオチドN2035

(5' -TTTATAATCTGCGCGCGCCGATTAATTTTC-3')

は、3'末端近傍のNotI部位の周囲にある、反対鎖上の1C3V_L配列に対して相補性を有するように合成された。

この二つのオリゴヌクレオチドは、BstEIIおよびNotI制限エンドヌクレアーゼ部位に隣接する5'-V_Lに並列された3'-V_H配列の1C3生成物を製造するために、1C3鋳型DNAと共にポリメラーゼ連鎖反応に用いられた。

制限エンドヌクレアーゼ部位BstEIIおよびNotIを有するPCR生成物をインキュベートした後、得られたフラグメントは、予めBstEIIおよびNotIで消化して介在配列を除去した、1C3・scFv配列を含むベクターpH

FAと連結された。この連結生成物は、大腸菌株TG1を形質転換するために用いられた。挿入物を含む形質転換体コロニーは、配列認識番号4に示したDNA配列を含むことが確認された。

この遺伝子構築物は、非抑制大腸菌株に導入され且つIPTGで誘導されたときに、このベクターまたは関連ベクター類中で発現され、また1C3コーディング領域を熱誘導性発現ベクターpPOWに導入することによって発現された。

実施例4 大腸菌の変異株を用いた突然変異

組換え抗ノイラミニダーゼ抗体NC10・scFvの発現をコードするNC10・scFvプラスミドを、電気穿孔法により大腸菌mutDに導入した。突然変異体は、サンプルを図11に示す突然変異サイクルに供することによって製造された。これらは、YT+AMP+TET中において、指数相で50世代だけ増殖され（プラスミドDNAの突然変異を誘発するため）、次いでヘルパーファージを用いて救出された。救出されたファージは、予め $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原をコーティングした免疫チューブに掛けられ、PBS等で洗浄して非結合ファージを除去し、特異的に結合したファージを100mMトリエチルアミンで溶出し、0.5容積の1M Tris-ヒドロキシメチルメチルアミン-HCl pH7.5中に回収し、次いで標準法によってmutD細胞中にトランスフェクトした（特に断らない限り、ここで言及する全ての標準法はSambrook et al., 1990の「分子クローニング-A実験室マニュアル」に記載されている）。また、細胞を対数相増殖に維持しながら、再度50世代の増殖を行なった。適切な回数の突然変異選別ラウンド（この実施例では3回）を実施した後のファージ力価は、 $10^7 \sim 10^8$ ファージ/ ml である。最終パンニング工程の後、溶出されたファージは大腸菌TG1細胞中にトラン

スフェクトされ、YT+AMP+グルコースのプレートに撒かれ、単離された各コロニーはファージ救出に先立って増殖され、「flu」ウイルスまたはグリコホリン上でのELISAによって分析された。ELISA活性のレベルで非野生型を発現したコロニーは、次いで増幅され、DNA配列が決定され、また可溶性の発現のために、該ファージはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

から入手可能な大腸菌HB2151中にトランスフェクトされた。このファージは標準法によってHB2151にトランスフェクトされ、夫々のファージサンプルの選別された個々のコロニーは、YT+AMP ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 中で増殖され、次いで1mMのIPTG (イソプロピルチオガラクトシド) を用いて37℃で4～16時間誘導され、引き続き4℃で16時間任意にインキュベートされた。この培養上清および周辺細胞質抽出物、細胞膜および細胞質を回収し、上記のようにして組換え遺伝子の発現について分析した (Power et al., 1992, Gene)。

実施例 5

国際出願番号第PCT/AU93/00228に号記載されているようにして調製したファジミドpHFA中の組換え1C3・scFv (グリコホリン結合性抗体コーディング領域) を、実施例4に記載したようにしてmutD大腸菌内でのランダム突然変異に供し、また選別プロトコルを同様に適用した。但し、この選別には固相マトリックス (ELISAプレート、免疫チューブまたはラテックスビーズ) をグリコホリンAのPBS溶液 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) でコーティングすることが含まれ

ている。個々のクローンを選別するためのELISAスクリーニングの結果は、図12に示されている。抗FLAG抗体での検出を用いた競合ELISA試験が、突然変異後の選別されたコロニーに対して行なわれた。表1は、発現されたタンパクの、抗原 (アジアログリコホリン) に対する相対的な親和性が増大したことを示している。

表 1

クローン化された 組換え scFv	突然変異	親和性 IM (オフ・レート)
1C3	w t	62
1C3・A13		40
1C3・B7		29

実施例 6

ファジミドベクターpHEN中のscFvライブラリー (メディカルリサーチ・カウンセル社、U. K.) を大腸菌のmutT株にトランスフェクトし、ま

た突然変異ならびに修飾された結合能力での s c F v の検出および選別のために、実施例 4 または 5 のように処理された。グリコホリンバイндаについて選別する。入手可能なグリコホリン結合性抗体の範囲を増やすために、突然変異およびファージ表現ライブラリーのアフィニティー選別の出発点として、本来の s c F v ライブラリーが用いられた。本来の s c F v ファージ表現ライブラリーから選別された二つの独特な抗グリコホリン s c F v は、その後に突然変異されることが示されたその V k 4

鎖の領域について示される推定アミノ酸配列を有しており、これは表 2 に示される。

表 2

FTASTGDVPDRFSGSGSGTDFTLRISLQAEDVAVYYCQQASVFP
CIYWNPDSPDRFSGSGSGTDFTLRISLQAEDVAVYYCQQASVFP

これら夫々の分子のアフィニティー成熟は、図 1 1 に示したように、突然変異 (mut D 5) アフィニティー選別サイクルを用いることによって達成された。突然変異分子のサブセットにもたらされる変化を表 3 に示す。

表 3

本来のライブラリ から選別された	突然変異 A. A. (位置)	親和性 μ M (オフ・レート)
s c F v		
A 9	w t	4 8
A 9. 5	S - V (98)	1 5
A 9. 1 3	G - D (63)	2 4
	V - S (64)	0. 06
E 3	w t	1 8
E 3. 1	S - Q (82)	9
E 3. 2	S - T (83)	2
C 1 2	w t	1 1
C 1 2. 1	G - Q (48)	3 5
C 1 2. 2	L - G (15)	1

実施例 7

D. ディスコイデウム中での抗体フラグメントコーディング領域の発現は、親ベクター p 569 (ドイツ国ミュンヘンのマックスプランク研究所のW.Nellen氏からの贈与) および以下に記載する V_H コーディング領域から構築された、ベクター A V 1 によるものである。ベクター p 569 は図 1 3 に示されている。これは、 α -L フコシダーゼプロモータ及び細胞表面に発現された「リガンド結合性ペプチド」の分泌のためのシグナル配列を用いた大腸菌 D. ディスコイデウム・シヤトルベクターの一つのファミリーである。表 4 は、抗 F L A G 抗体 (M 2) によって検出された、インフルエンザ N C 4 1 V_H F L A G の発現のイムノドットプロットの結果を示している。

モノクローナル抗体 N C 4 1 の V_H コーディング配列が、下記のオリゴヌクレオチド配列を用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅された。

N 8 4 9

5' CCTTGCCTGCAGGTCCGACCTATGGACAGGTGCAGCTGCAGCAG 3'

N 8 6 3

5' TTACCATGGTTACTTGACCTTAATCAGCAGGACAAATGAAATAAATTTATCATCAT
CATCTTTATAATC 5'

N 8 4 9 は、 α -L-フコシダーゼシグナル配列、開裂部位ならびに発現ベクター p 5 6 9 へのクローニングに適した S a l I 制限部位と共に、NC 4 1 V_H コーディング領域の N 末端に対して相補的な配列を含んでいる。

N 8 6 3 は、トランスメンブラン疎水性配列、クローニングのための N c o I 制限部位および翻訳停止コドンと共に、NC 4 1 V_H の F L A G コーディング配列に対して相補的な配列を含んでいる。

ベクター p A V 5 6 9 (ドイツ国マルチンスライドのマックスプランク研究所の W. Nellen 氏からの贈与) の DNA を制限酵素 N c o I および S a l I で消化し、切断されたベクターを、アガロース電気泳動およびフェノール抽出の標準技術によって精製した。

P C R で増幅され、制限酵素で消化された NC 4 1 V_H · F L A G をベクター中に連結し、この混合物を大腸菌に形質転換した。組換え体コロニーをアンピシリン含有 Y T プレート上で選別し、組換えプラスミドを回収し、標準技術を用いて精製および同定した。この組換えプラスミドは、p A V 1 と称する。

組換えプラスミド p A V 1 を、Friendlander and Mella によって G B -2159821 に開示された摂食法 (feeding method) を用いることによって、D. ディスコイデムの休止細胞中に形質転換した。

組換え体 D. ディスコイデムを、DMB 培地上において、 $10\mu\text{g/ml}$ の抗生物質 G 4 1 8 を用いて選別した。組換え体 D. ディスコイデム・アモエバエ (D. Discoideum amoebae) を、 $10\mu\text{g/ml}$ の G 4 1 8 を含む DMB 培地の 2 ml 培養で増殖させた。22℃で48時間の増殖の後、培養上清の $100\mu\text{l}$ アリコートについてドットプロット分析を行ない、抗 F L A G

抗体を用いて、培養中の NC 1 0 V_H · F L A G 抗体フラグメントの存在を検出した。その結果を表 4 に示す。

表 4

D. ディスコイデウムにおける

NC10V_H - FLAGの発現

抗FLAG抗体を用いたドットプロット免疫検出

D. ディスコイデウムのクローン# 抗体による検出

陰性対照	—
陰性対照	—
陽性対照	+++
9C組換えD. ディスコイデム	+
9D "	—
9E "	++
9F "	—
9G "	++
8B "	+++
8C "	—
8D "	+++
8E "	+++
8F "	—
8G "	+++
7D "	+
7E "	—
7F "	+
7G "	—

— : 反応なし

+++ : 強い反応

+ : 弱い反応

実施例 8

D. ディスコイデウム内の発現のための、1C3Fabを含む組換えベクターの構築。親ベクター (p569) の構造は図13に示されており、該ベクター

は、制限消化によるB a m H I / B g l IIフラグメントの除去および再連結によって修飾され、下記のプライマーおよび鋳型としての1 C 3 F a bを用いたP C Rで構築された抗体コーディング領域をクローニングするための、独特のX b a IおよびS s p I部位が残された。

5' CAGGTCGACTCTAGAGTATGGGAGGTGAGGCTTCTCGAG 3'

5' AAATTTATAATTATTTATCATCATCATCTTTATAATC 3'

このF a bは、グリコホリン並びに抗F L A Gおよび抗E E F抗体についての結合活性(T B R s)を組合せているから、多官能性ポリペプチドである。P C R生成物の制限消化に続いて、大腸菌における構築のために、標準的な精製、連結および形質転換プロトコールが行なわれた。D. ディスコイデウムの形質転換は、摂食形質転換された大腸菌によって(G B -2159821A参照)、或いはリン酸カルシウム結晶法(Nellen et al., Mol. Cell. Biol., 1984, 4, 2890-2898)もしくは電気穿孔法(Howard et al., 1988, 16, 2613-2623)のような文

献に発表された当業者に公知の標準法により、G 418 (ゲネチシン (geneticin)) 上での選別を伴って行なわれる。

本発明の一般的な範囲が、上記で詳細に述べた特定の実施例に限定されないことは明瞭に理解されるであろう。

配列確認番号1

ファイル: B: \POWLY23V.配列

説明: FLAG尾部を有するMscI-SalIに連結されたJLApe1B Ly-2+Ly-3 Vドメイン

塩基番号: 1 ~ 8 4 9

全塩基数: 8 4 9

```

      M K V L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG

      M A K P Q A P E L R I F P K K M D A E L
61 ATGGCCAAGC CACAGGCACC CGAACTCCGA ATCTTTCCAA AGAAAATGGA CGCCGAACCT

      G Q K V D L V C E V L G S V S Q G C S W
121 GGTCAGAAGG TGGACCTGGT ATGTGAAGTG TTGGGGTCCG TTTGCAAGG ATGCTCTTGG

      L F Q N S S S K L P Q P T F V V Y M A S
181 CTCTTCCAGA ACTCCAGCTC CAAACTCCCC CAGCCACCT TCGTTGTCTA TATGGCTTCA

      S H N K I T W D E K L N S S K L F S A M
241 TCCACAACA AGATAACGTG GGACGAGAAG CTGAATTCGT CGAAACTGTT TTCTGCCATG

      R D T N N K Y V L T L N K F S K E N E G
301 AGGGACACGA ATAATAAGTA CGTTCTCACC CTGAACAAGT TCAGCAAGGA AAACGAAGGC

      Y Y F C S V I S N S V M Y F S S V V P V
361 TACTATTCTT GCTCAGTCAT CAGCAACTCG GTGATGTACT TCAGTTCTGT CGTGCCAGTC

      L Q G G G G S G G G G S G G G S L I Q
421 CTTCAGGCTG GCGGAGGCTC AGGCGGTGGT GGATCAGGTG GCGGCGGATC TCTCATTGAG

      T P S S L L V Q T N H T A K M S C E V K
481 ACCCTTCTCT CCCTGCTGGT TCAAACCAAC CATACGGCAA AGATGTCCTG TGAGGTTAAA

      S I S K L T S I Y W L R E R Q D P K D K
541 AGCATCTCTA AGTTAACAAG CATCTACTGG CTGCGGGAGC GCCAGGACCC CAAGGACAAG

      Y F E F L A S W S S S K G V L Y G E S V
601 TACTTTGAGT TCCTGCCCTC CTGCAGTTCT TCCAAAGGAG TTTTCTATGG TGAAAGTGTC

      D K K R N I I L E S S D S R R P F L S I
661 GACAAGAAAA GAAATATAAT TCTTGAGTCT TCAGACTCAA GACGGCCCTT TCTCACTATC

      M N V K P E D S D F Y F C A T V G S P K
721 ATGAATGTGA AGCCAGAGGA CAGTGACTTC TACTTCTGCG CGACGGTTGG GAGCCCCAAG

      M V F G T G T K L T V V D Y K D D D D K
781 ATGGTCTTTG GGACAGGGAC GAAGCTGACT GTGGTTGATT ACAAGGACGA CGATGACAAG

      * S T
841 TAGTCGACA

```

配列確認番号2

ファイル: B:\CD8ACD8B.配列

説明: pPOW (pe1B CD8aおよびCD8b V dom) 中のヒト単鎖CD8

塩基番号: 1~822

全塩基数: 822

```

      M K Y L L P T A A A C L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GCATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG
      H A S Q F R V S P L D R T W N L G E T V
61 ATGGCCAGCC AGTTCCGGGT GTCCCGCTG GATCGGACCT GGAACCTGGG CGAGACAGTG
      E L K C Q V L L S N P T S G C S W L F Q
121 GAGCTGAAGT GCCAGGTGCT GCTGTCCAAC CCGACGTCGG GCTGCTCGTG GCTCTTCAG
      P R G A A A S P T F L L Y L S Q N K P K
181 CCGCGCGCGG CCGCGGCCAG TCCACCTTC CTCCTATACC TCTCCCAAAA CAAGCCCAAG
      A A E G L D T Q R F S G K R L G D T F V
241 GCGGCGGAGG GGCTGGACAC CCAGCGGTTT TCGGGCAAGA GGTGGGGGA CACCTTCGTC
      L T L S D F R R E N E G Y Y F C S A L S
301 CTCACCTGA GCGACTTCG CCGAGAGAAC GAGGGCTACT ATTTCTGCTC GGCCCTGAGC
      N S I M Y F S H F V P V F L P A G G R G
361 AACTCCATCA TGTACTTCAG CCACTTCGTG CCGGTCTTCC TGCCAGCGGG CGGCCGCGGT
      S G G G G S G G G G S L Q Q T P A Y I K
421 TCAGGTGGAG GTGGATCCGG AGGCGGTGGA TCTCTCCAGC AGACCCCTGC ATACATAAAG
      V Q T N K M V M L S C E A K I S L S N M
481 GTGCAAACCA ACAAGATGGT GATGCTGTCC TGCGAGGCTA AAATCTCCCT CAGTAACATG
      R I Y W L R Q R Q A P S S D S H H E F L
541 CGCATCTACT GGCTGAGACA GCGCCAGGCA CCGAGCAGTG ACAGTCACCA CGAGTTCCTG
      A L W D S A K G T I H G E E V E Q E K I
601 CCCCTCTGGG ATTCCGCAAA AGGGACTATC CACGGTGAAC ACCTCCAACA GCACAAGATA
      A V F R D A S R F I L N L T S V K P E D
661 GCTGTGTTTC GGGATGCAAG CCGGTTTATT CTCAATCTCA CAAGCGTGA CCCGGAAGAC
      S G I Y F C M I V G S P E L T F G K G T
721 ACTGGCATCT ACTTCTGCAT GATCGTCGGG AGCCCCGAGC TGACCTTCGG GAACCGAACT
      Q L S V V D Y K D D D D K .
781 CACCTCACTC TCCTTGATTG CAAGCACGAC GATGACAACT AG

```

配列確認番号3

ファイル: B:\MHCA3.配列

説明: pPOW pe1B Msc-EcoRI (FLAGなし) 中のMHCI a3 H-2Kドメイン

塩基番号: 1 ~ 371

全塩基数: 371


```
      M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG
      H A K A H V T H H R R P E G D V T L R C
61 ATGGCCCAAGG CCCATGTCAC CCATCACCGC AGACCTGAAG GTGATGTCAC CCTGAGGTGC
      W A L G F Y P A D I T L T W Q L N G D E
121 TGGGCCCTGG GCTTCTACCC TGCTGACATC ACCCTGACCT GCCAGTTGAA TGGGGACGAG
      L T Q E H E L V E T R P A G D G T F Q K
181 CTGACCCAGG AAATGGAGCT TGTGGAGACC AGGCCTGCAG GGCATGGAAC CTTCCAGAAG
      W A S V V V P L G K E Q K Y T C H V E H
241 TGGGCATCTG TGGTGGTGCC TCTTGGGAAG GAGCAGAAGT ACACATGCCA TGTGGAACAT
      E G L P E P L T L R W G K E E P P S S T
301 GAGGGGCTGC CTGAGCCCCT CACCCTGAGA TGGGGCAAGG AGGAGCCTCC TTCATCCACC
      K * N
361 AAGTAGAATT C
```

配列確認番号 4

pHFA中に構築されたリンカー無しの1C3

pHFA中のHind III部位から遺伝子3配列の開始まで

```

1  aag ctt gca tgc aaa ttc tat ttc aag gag aca gcc ata ATG AAA TAC
    L  L  P  T  A  A  A  G  L  L  L  L  A  A  Q  P
49  CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG
    A  M  A  E  V  K  L  Q  E  S  G  G  G  P  V  Q
97  GCC ATG GCC GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGA GGT GGC CCG GTA CAA
    P  G  G  S  L  K  L  S  C  A  A  S  G  F  D  F
145  CCT GGA GGA TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCA GGA TTC GAT TTT
    S  R  Y  W  M  N  W  V  R  R  A  P  G  K  G  L
193  AGT AGA TAC TGG ATG AAT TGG GTC CGG CGG GCT CCA GGG AAG GGG CTA
    E  W  I  G  E  I  N  Q  Q  S  S  T  I  N  Y  S
241  GAG TGG ATT GGA GAA ATT AAT CAA CAA AGC AGT ACG ATA AAC TAT TCG
    P  P  L  K  D  K  F  I  I  S  R  D  N  A  K  S
289  CCA CCT CTG AAG GAT AAA TTC ATC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAA AGT
    T  L  Y  L  Q  M  N  K  V  R  S  E  D  T  A  L
337  ACG CTG TAC CTG CAA ATG AAC AAA GTG AGA TCT GAG GAC ACA GCC CTT
    Y  Y  C  A  R  L  S  L  T  A  A  G  F  A  Y  W
385  TAT TAT TGT GCA AGA CTT TCT CTT ACT GCG GCA GGG TTT GCT TAC TGG
    G  Q  G  T  L  V  T  V  A  S  D  I  V  M  S  Q
433  GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACC GTC GCC TCC GAC ATC GTC ATG TCA CAG
    S  P  S  S  L  A  V  S  V  G  E  K  V  T  M  S
481  TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG TCA GTA GGA GAG AAG GTC ACT ATG AGC
    C  R  S  S  Q  S  L  F  N  S  R  T  R  K  N  Y
529  TGC AGA TCC AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC
    L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  S  P  K  P  L  I
577  TTG ACT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CCG CTG ATC
    Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R  F  T  G
625  TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
    S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  V  Q  A
673  AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT
    E  D  L  A  D  Y  Y  C  K  Q  S  Y  N  L  R  T
721  GAA GAC CTG GCA GAT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTT CGG ACG
    F  G  G  G  T  K  L  E  I  N  R  A  A  A  D  Y
769  TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATT AAT CGG GCG GCC GCA GAT TAT
    K  D  D  D  D  K  A  A  T  V  E  S  C  L
817  AAA GAT GAT GAT GAT AAA TAG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA
    A  K
865  CCA AAA.....

```

配列確認番号 5

全塩基数： 1 4 4 3

1 aaaaaagcGG CCCAGCCGGC CATGGCCGAG GTGAGGCTTC TCGACTCTGG AGGTGGCCCG
 61 GTACAACCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGCCT CAGGATTCCA TTTTAGTAGA
 121 TACTGGATGA ATTGGgtcCG GCGCGCTCCA GGAAGGGGC TAGAGTGGAT TGGAGAAATT
 181 AATCAACAAA GCAGTACGAT AAACCTATTCG CCACCTCTGA AGGATAAAATT CATCATCTCC
 241 AGAGACAACG CCAAAAGTAC GCTGTACCTG CAAATGAACA AAGTGAGATC TGAGGACACA
 301 GCCCTTTATT ATTGTGCAAG ACTTTCTCTT ACTGCGGCAG GGTTCGCTTA CTGGGGCCAA
 361 GGGACTCTGG TCACTGTCTC TGCAGCCAAA ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC
 421 CCTGGATCTG CTGCCCCAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGCCTGGT CAAGGGCTAT
 481 TTCCCTGAGC CAGTGACAGT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCCAGCGG TGTGCACACC
 541 TTCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACTCTGAGCA GCTCACTGAC TGTECCCTCC
 601 AGCACCTGGC CCAGCGAGAC CGTCACCTGC AACGTTGCCC ACCCGGCCAG CAGCACCAAG
 661 GTGGACAAGA AAATTgaaga attttaatta aaacatgga ataaaGTGAA ACAAAAGCACT
 721 ATTGCACTGG CACTCTTACC GTTACTGTTT ACCCCGGTAA CCAAAGCCGA CATCGTCATG
 781 TCACAGTCTC CATCCTCCCT GGCTGTGTCA GTAGGAGAGA AGGTCACATAT GAGCTGCAGA
 841 TCCAGTCAGA GTCTGTTCAA CAGTAGAACC CGAAAGAACT ACTTGACTTG GTACCAGCAG
 901 AAACCAGGGC AGTCTCCTAA ACCGCTGATC TACTGGGCAT CCACTAGGGA ATCTGGGGTC
 961 CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGTGTG
 1021 CAGGCTGAAG ACCTGGCAGA TTATTACTGC AAGCAATCTT ATAATCTTCG GACGTTGGGT
 1081 GGAGGCACCA AGCTGGAAT TAAACGGGCT GATGCTCCAG TATCCATCTT CCAACCATCC
 1141 ACTGAGCAGT TAACATCTGG ATCTGGAGGT GCCTCACTCG TCTGCTTCTT GAACAACCTC
 1201 TACCCCAAAG ACATCAATCT CAAGTGGAAG ATTGATGGCA GTCAACCACA AAATCCGCTC
 1261 CTGAACAGTT CCACTGATCA GGACAGCAAA GACAGCAGCT ACAGCATGAG CAGCACCTTC
 1321 ACGTTGACCA AGGACGAGTA TCAACGACAT AACAGCTATA CCTGTGAGGC CACTCAAAAG
 1381 ACATCAACTT CACCCATTGT CAAGAGCTTC AACAGGqgag AGTGTgqgqg cgcagactat
 1441 aaa

【図1】

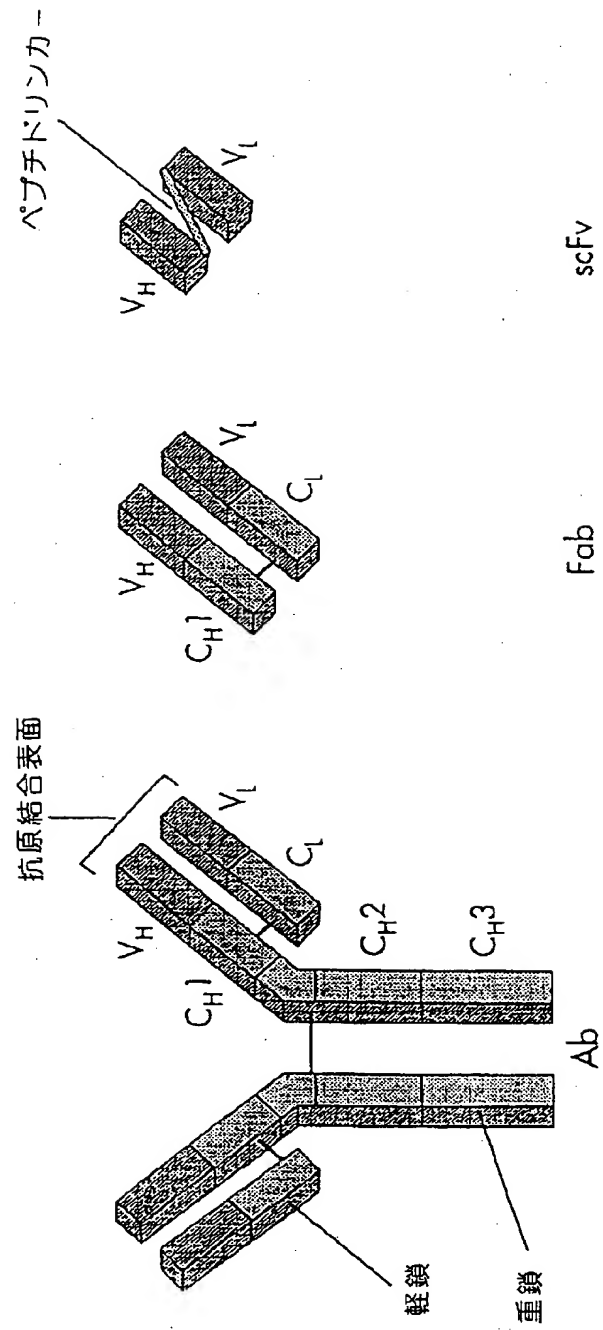


FIGURE 1

【図2】

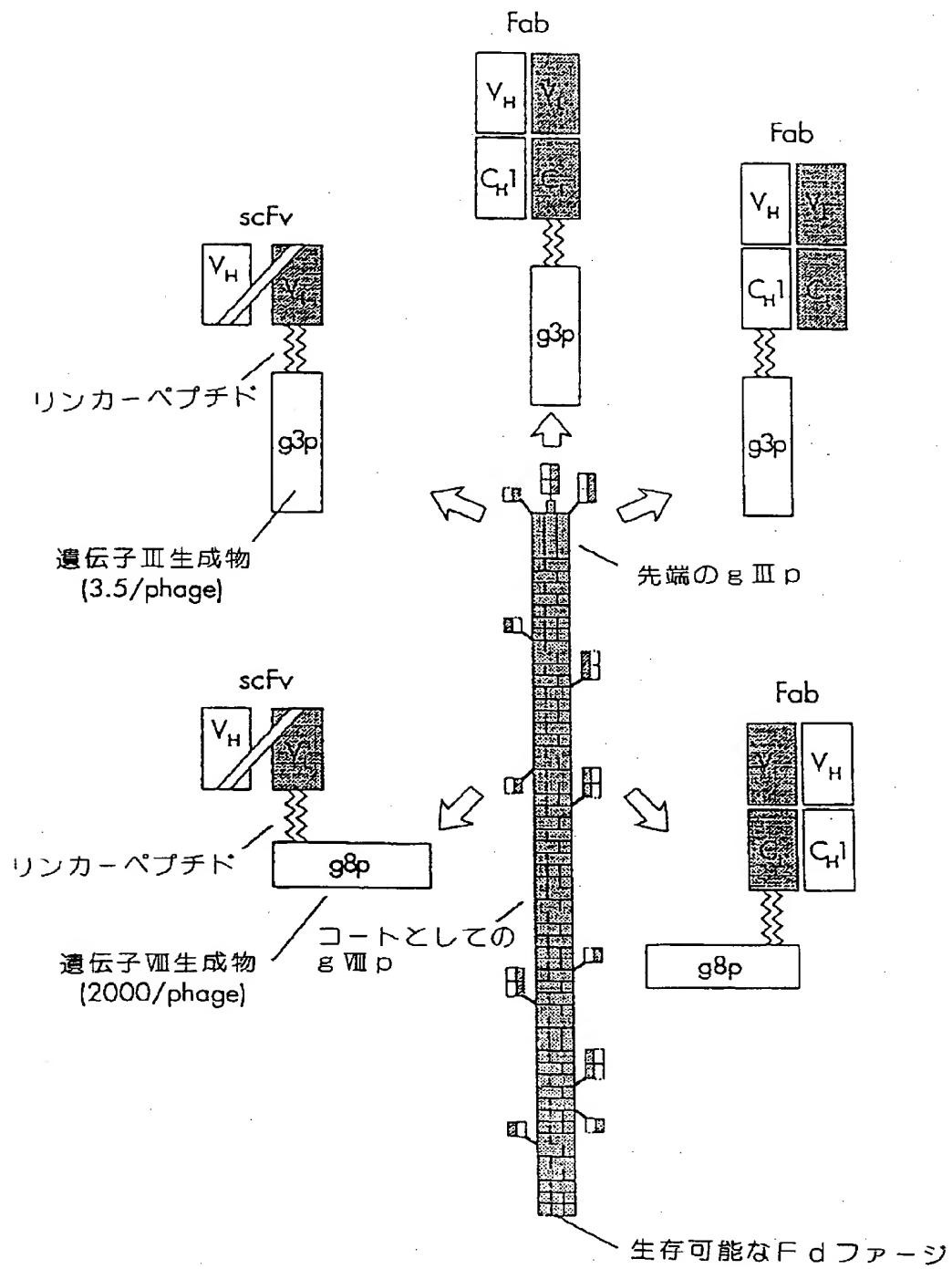


FIGURE 2

【図3】

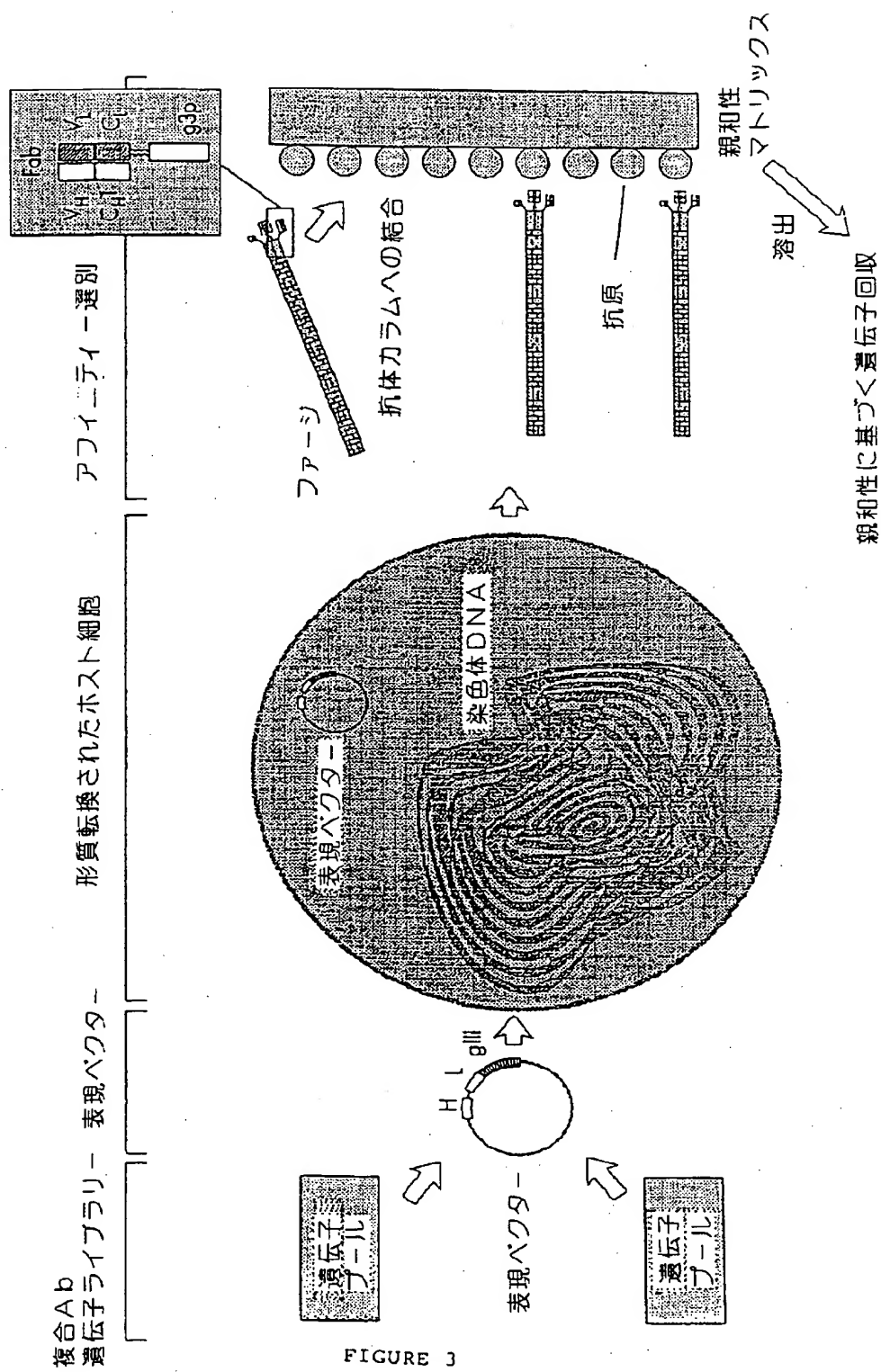


FIGURE 3

【图4】

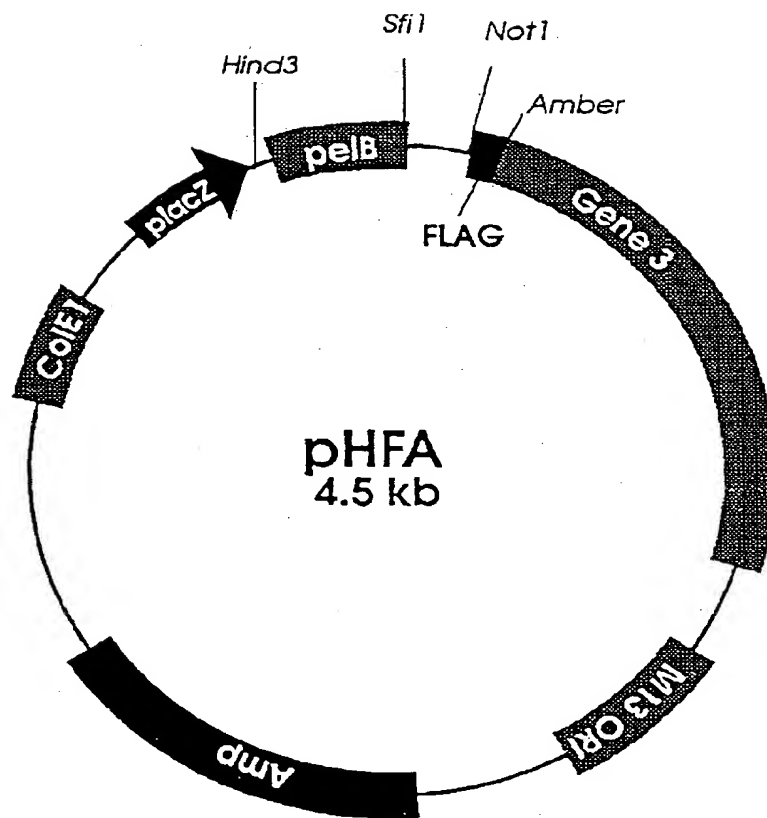


FIGURE 4

【図5】

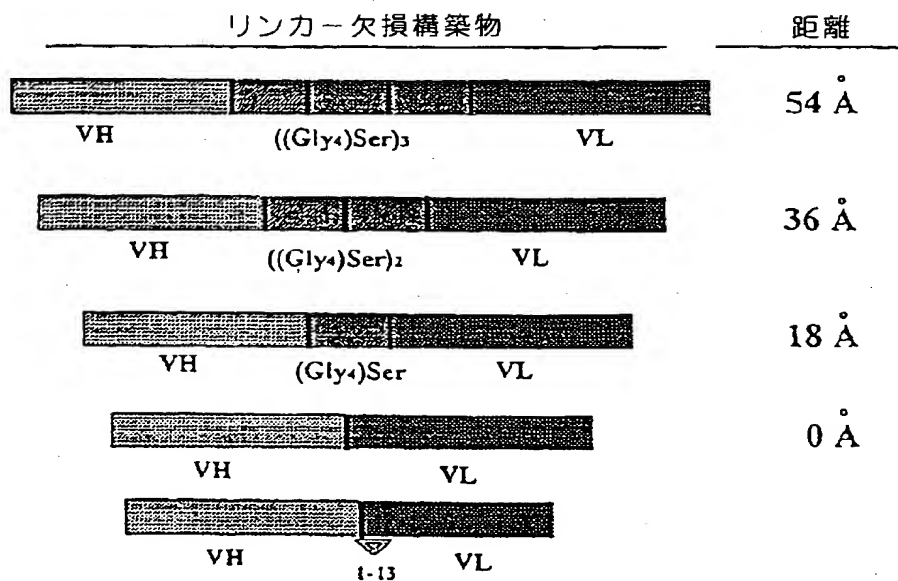


FIGURE 5

【図6】

リンカー欠損構築物

構築物	相補性オリゴヌクレオチド対
((Gly4)Ser) ₃	5' GTC ACC GTC TCC (GGT GGT GGT GGT TCG) ₃ GAT ATC GAG CT 3' 3' G CAG AGG (CCA CCA CCA CCA AGC) ₃ CTA TAG C 5'
((Gly4)Ser) ₂	5' GTC ACC GTC TCC (GGT GGT GGT GGT TCG) ₂ GAT ATC CAG CT 3' 3' G CAG AGG (CCA CCA CCA CCA AGC) ₂ CTA TAG C 5'
(Gly4)Ser	5' GTC ACC GTC TCC GGT GGT GGT GGT TCG GAT ATC GAG CT 3' 3' G CAG AGG CCA CCA CCA CCA AGC CTA TAG C 5'
-	5' GTC ACC GTC TCC GAT ATC GAG CT 3' 3' G CAG AGG CTA TAG C 5'
-13.VL	5' GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC 5' GTC GAC GAA TTC TTA TTA TTT ATC GTC ATC ATC TTT GTA GTC 3'

FIGURE 6

【图7】

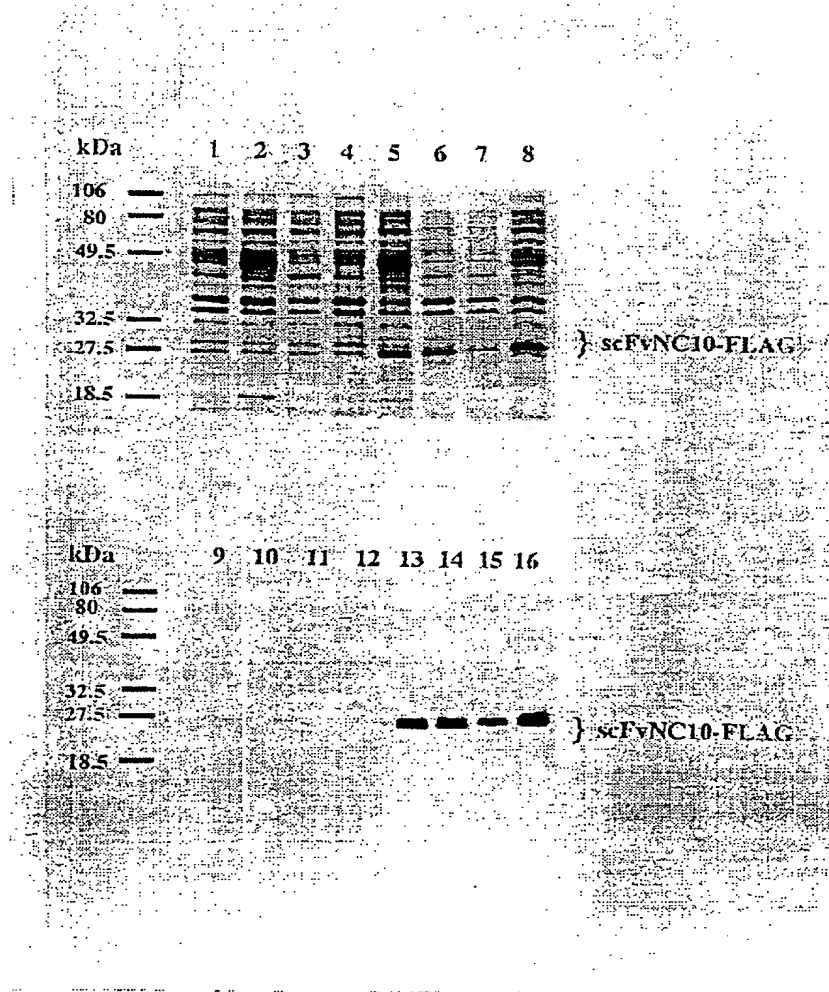


FIGURE 7

【図8】

リンカー欠損構築物

<u>リンカー単位</u>	<u>観察された形</u>	<u>活性</u>
$((\text{Gly}_4)\text{Ser})_3$	モノマー & 二量体	++
$((\text{Gly}_4)\text{Ser})_2$	二量体	++
$(\text{Gly}_4)\text{Ser}$	二量体	++
-	多量体	+
-13.VL Δ	多量体	

FIGURE 8

【図9a】

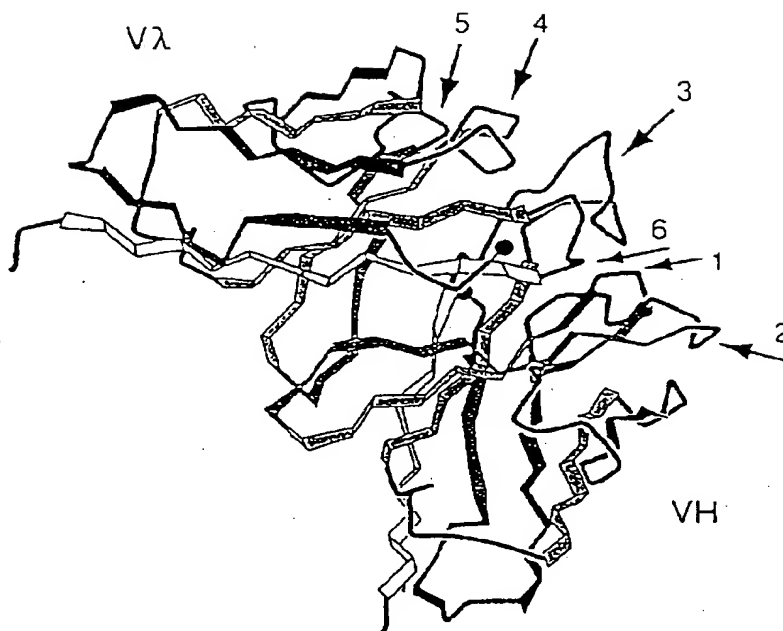


FIGURE 9a

【図9b】

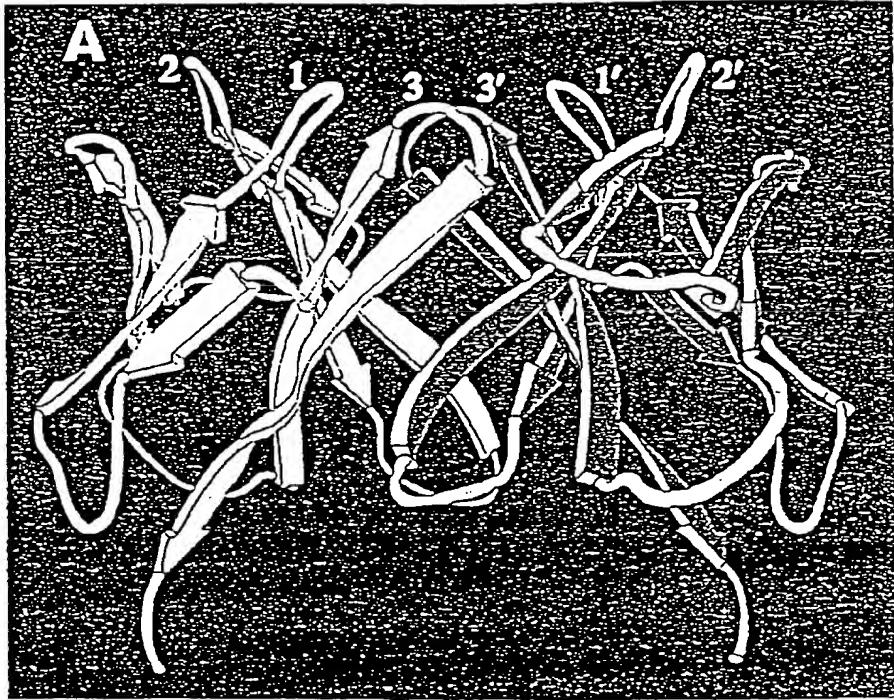


FIGURE 9b

【図10】

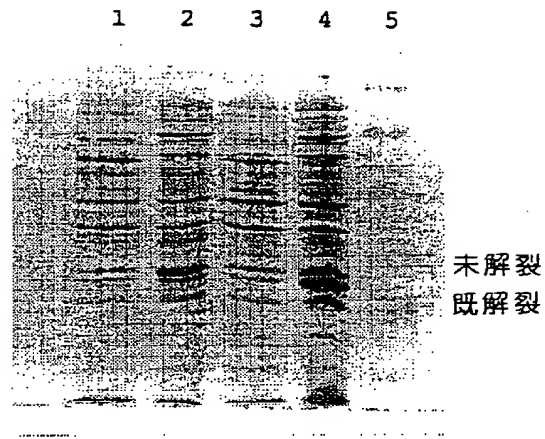


FIGURE 10

【図11】

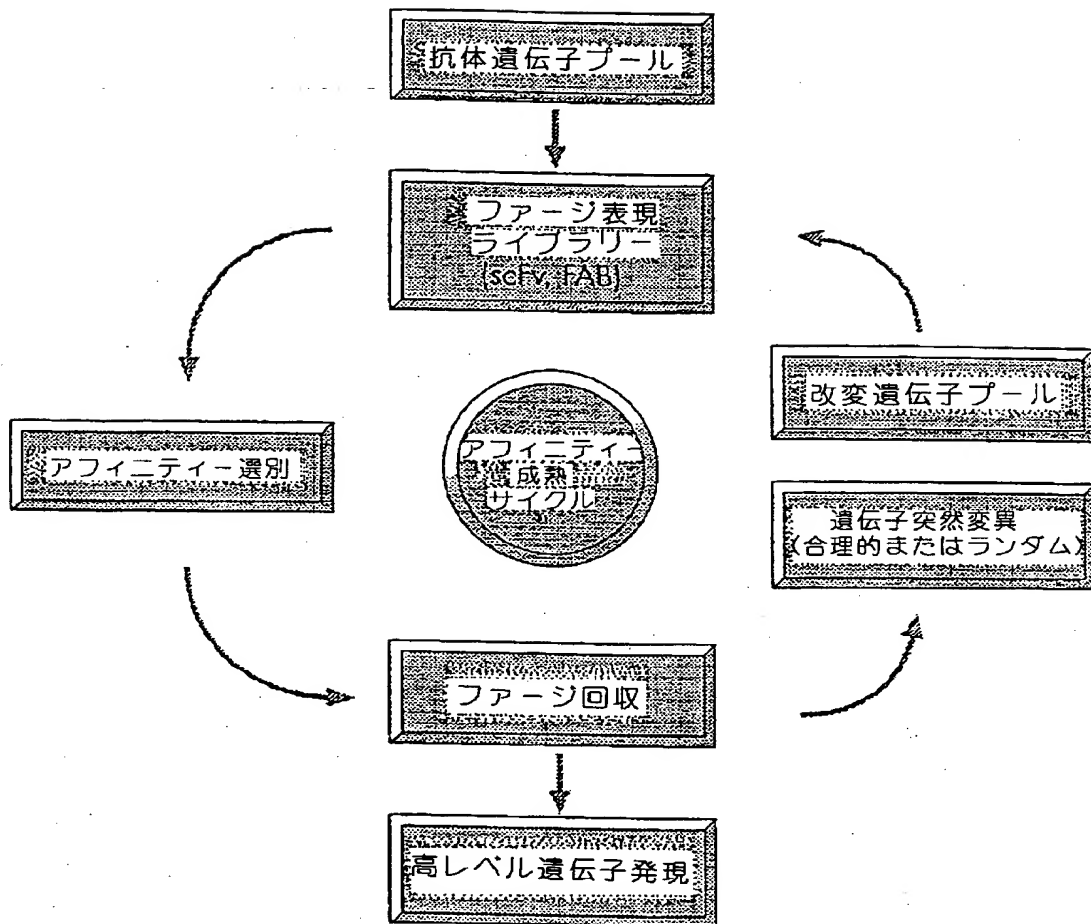


FIGURE 11

【図12】

突然変異 1C3scFv Culture S/Nに対するELISA
個々のコロニーの選別

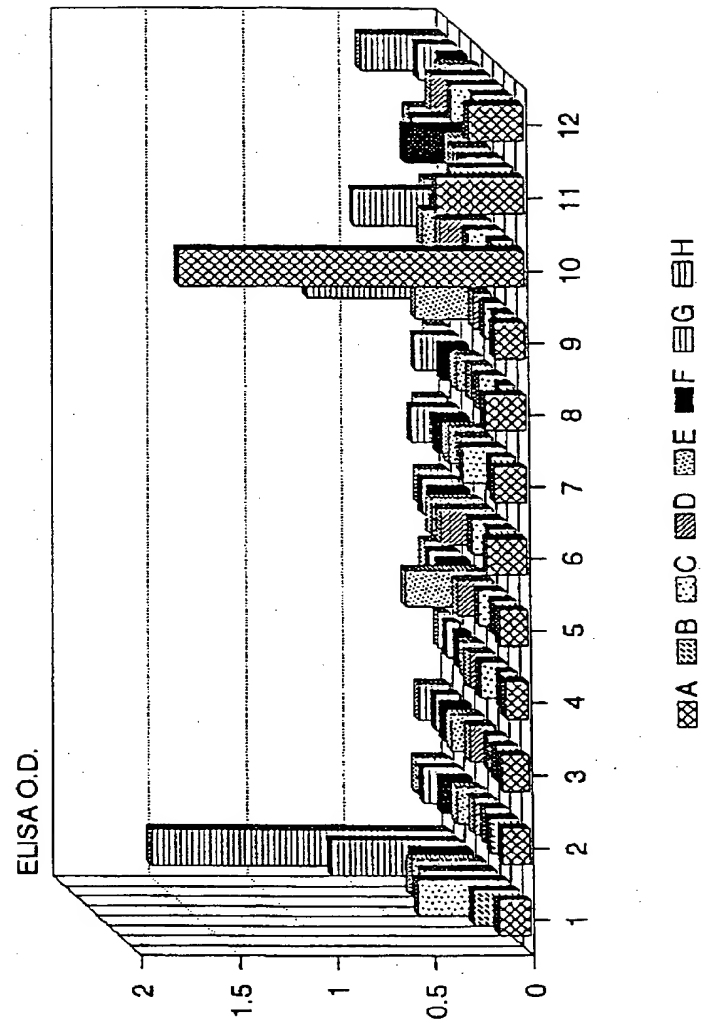


FIGURE 12

【図13】

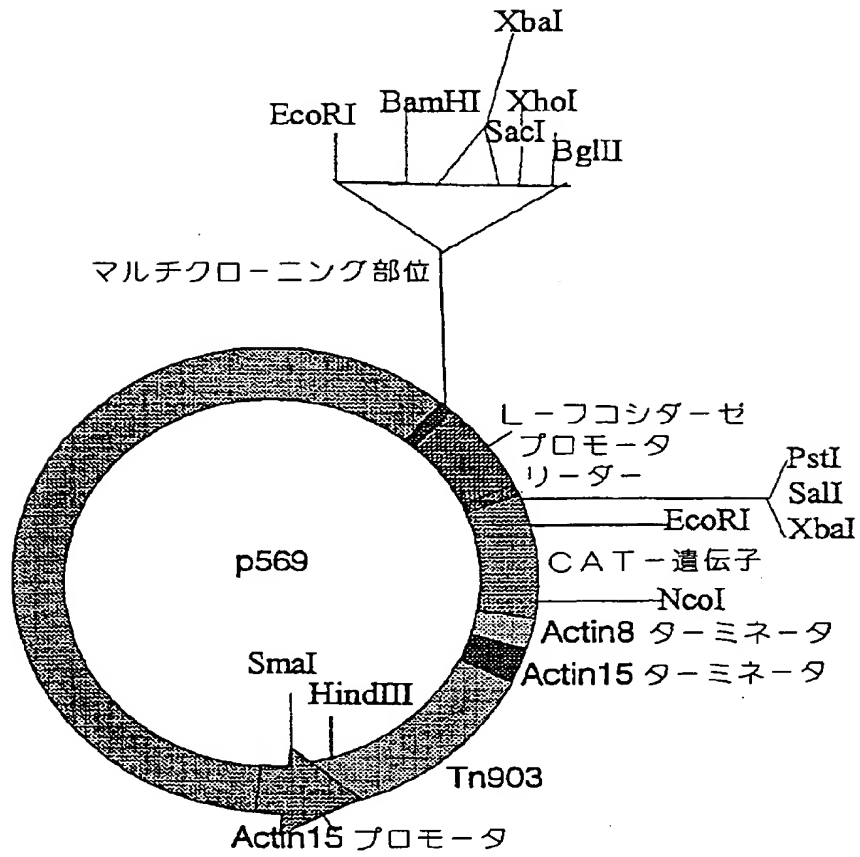


FIGURE 13

【图14】

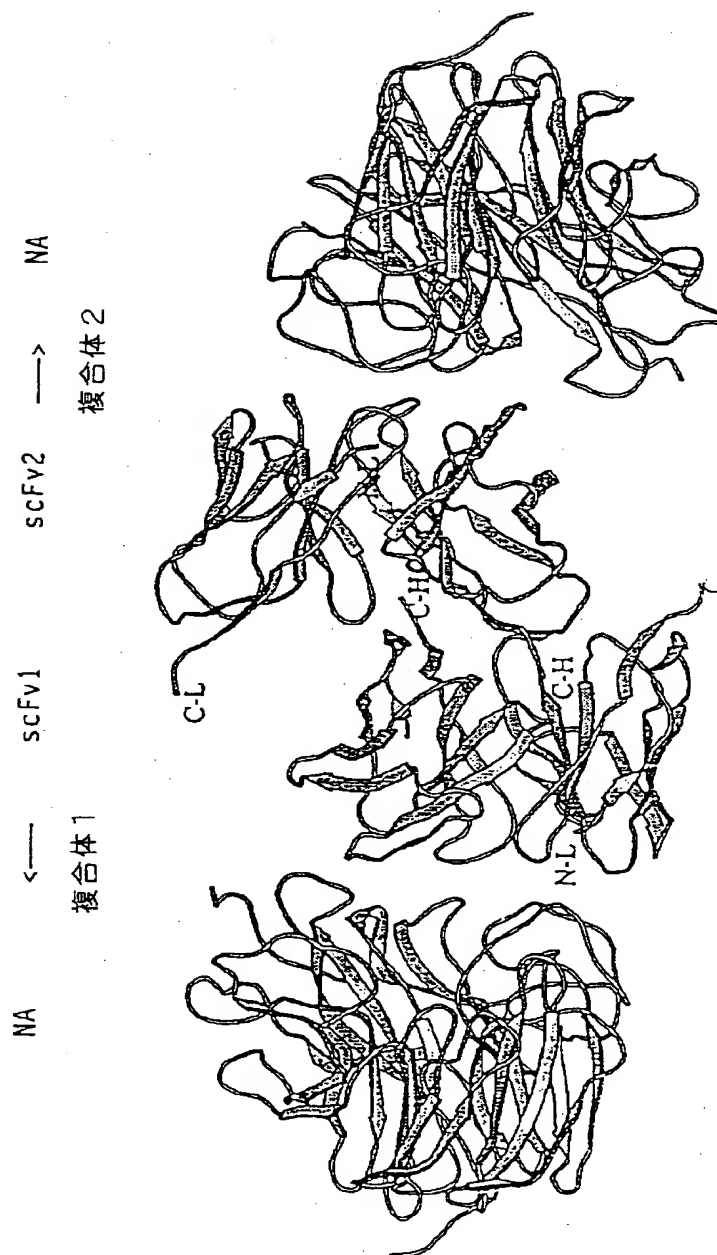


FIGURE 14

【図15】

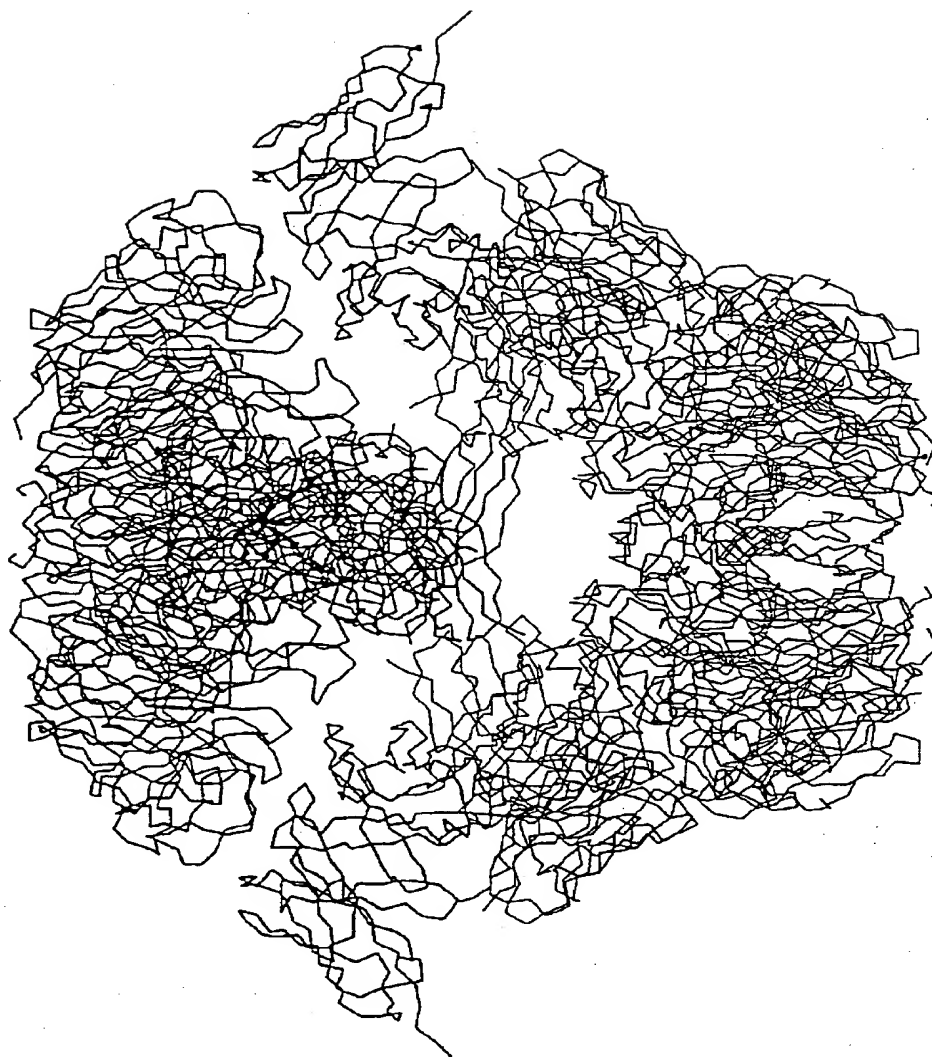


FIGURE 15

【図16】

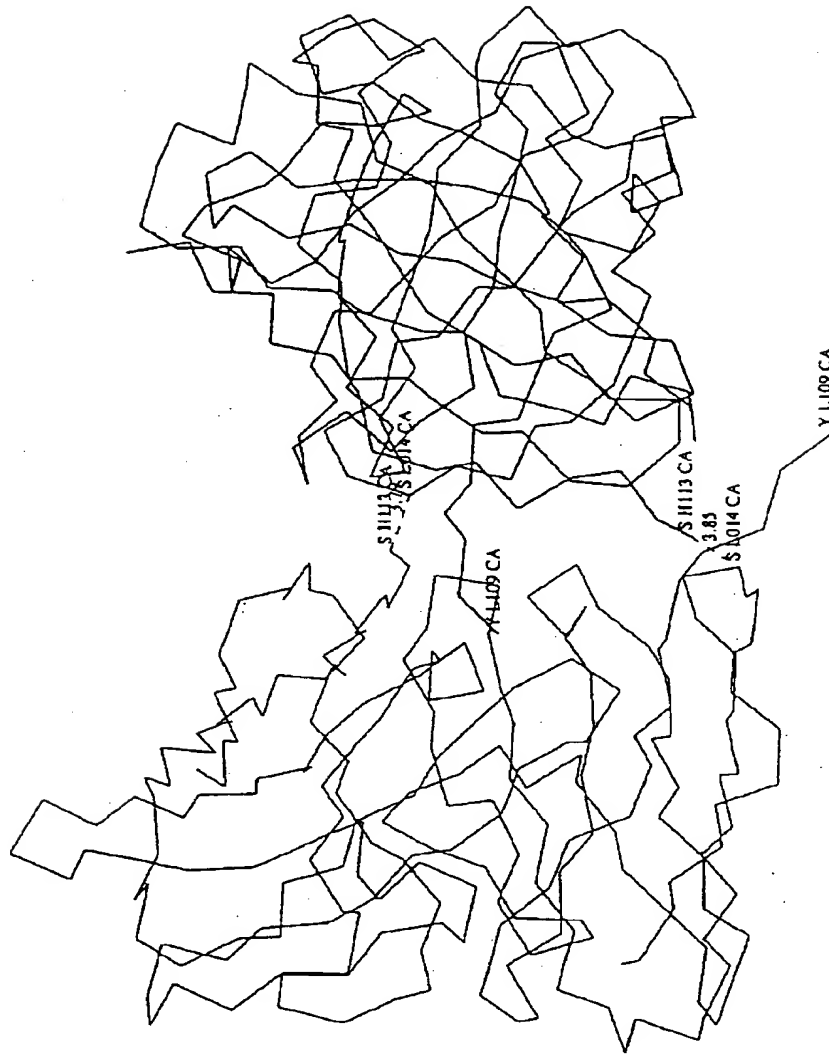


FIGURE 16

【図17】

s c F v s 二量体の形成

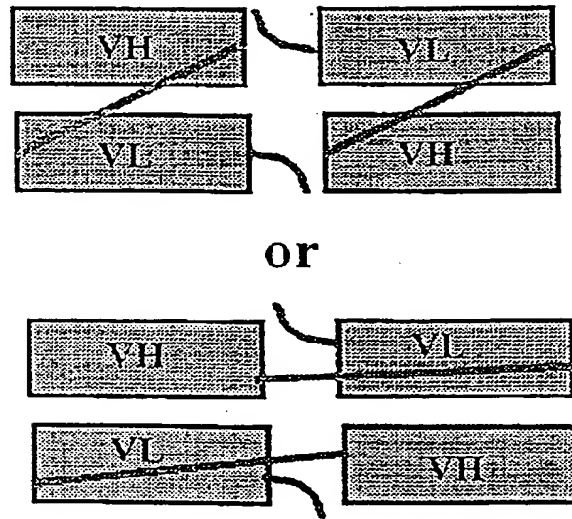


FIGURE 17

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年9月21日

【補正内容】

りも高い（約70%；なおIgGは30%）。従って、種々様々な抗原を結合できるように広範な成熟（進化）を予定した抗体ライブラリーを構築するための、理想的な遺伝子材料の供給源を提供する。

【発明の概要】

従って、本発明の範囲内には下記の事項が含まれる。

- 1) 標的に対して結合する新規な組換えポリペプチドの同定および構築。
- 2) このようなポリペプチド剤を、例えばそのDNAコード領域の突然変異を含む機構によって改変し、その性能を変えること。
- 3) 更に、サブコンポーネントの再組合わせにより、遺伝子レベルまたはタンパクレベルの何れかにおいて、これらのポリペプチド剤を変化させること。

第一の側面に従えば、本発明は、標的結合性の組換えポリペプチドであって、

- a) 安定なコアポリペプチド領域（SCR）と、
- b) 少なくとも一つの標的結合領域（TBR）

とを具備し、

前記標的結合領域は、標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを経ているポリペプチドを提供する。

我々は、結合の特異性、親和性または結合活性が改変された本発明によるポリペプチドを、成熟工程の実施を必要とす。

結合している4つのscFv分子から構成される。電子顕微鏡によって、2つのノイラミニダーゼ四量体が、四つの二官能性scFv二量体によって緊密に結合している事が確認された（図15）。NC10・MabのscFv構築物との間で複合を形成しているインフルエンザ・ノイラミニダーゼのアジサシN9（鳥類）株について、高解像度の電子顕微鏡観察を行なった。ここで、該分子複合体はホスホタングステン酸カリウム（potassium phospho-tungstate）（pH7.0）、または酢酸ウラニル（pH4.0）によって染色（コントラスト化）した。

同じN9NAの、モノクローナルFab (32/3、NC35およびNC41)との分子複合体および全モノクローナルIgGs (32/3、NC41およびNC10)との分子複合体を画像化した、我々が以前に行なった広範な実験に基づいて、我々は、N9Na-scFv複合体の画像を、4つの架橋scFv二量体によって面と面で結合したノイラミニダーゼの頭部対の閉じた構造であり、この結合は緊密に充填された分子複合体が4重の点対称を維持するように行なわれていると解析することができた(図15)。N9Na-scFv分子複合体のこの画像解析は、溶液中で観察された複合体の分子量、Mr 610,000とまさに一致している。

scFvがノイラミニダーゼと複合体を形成している結晶のX線回折(図14)では、二重の回転軸によって関係づけられる二つのscFv分子の間に緊密な会合ある事が実証された。二つの可能な二量体構造が考えられる。最初の例にお

スフェクトされ、YT+AMP+グルコースのプレートに撒かれ、単離された各コロニーはファージ救出に先立って増殖され、「flu」ウイルスまたはグリコホリン上でのELISAによって分析された。ELISA活性のレベルで非野生型を発現したコロニーは、次いで増幅され、DNA配列が決定され、また可溶性の発現のために、該ファージはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能な大腸菌HB2151中にトランスフェクトされた。このファージは標準法によってHB2151にトランスフェクトされ、夫々のファージサンプルの選別された個々のコロニーは、YT+AMP (100 μ g/ml)中で増殖され、次いで1mMのIPTG (イソプロピルチオガラクトシド)を用いて37℃で4~16時間誘導され、引き続き4℃で16時間任意にインキュベートされた。この培養上清および周辺細胞質抽出物、細胞膜および細胞質を回収し、上記のようにして組換え遺伝子の発現について分析した (Power et al., Gene 1992 113 95-99)。

実施例5

国際出願番号第PCT/AU93/00228に号記載されているようにして調製したファージミドpHFA中の組換え1C3-scFv (グリコホリン結合性抗体コーディング領域)を、実施例4に記載したようにしてmutD大腸菌内でのランダム突

然変異に供し、また選別プロトコルを同様に適用した。但し、この選別には固相マトリックス (ELISAプレート、免疫チューブまたはラテックスビーズ) をグリコホリンAのPBS溶液 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) でコーティングすることが含まれ

請求の範囲

1. 標的結合性の組換えポリペプチドであって、
 - a) 安定なコアポリペプチド領域 (SCR) と、
 - b) 少なくとも一つの標的結合領域 (TBR)

とを具備し、

前記標的結合領域は、前記SCRに共有結合体に結合しており、また標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを受けているポリペプチド。

2. 請求項1に記載のポリペプチドであって、自己会合して安定な二量体、凝集体またはアレイを形成することができるポリペプチド。

3. 請求項1または2に記載のポリペプチドであって、前記SCRおよびTBRがリンカー成分によって結合されているポリペプチド。

4. 請求項1～3の何れか1項に記載のポリペプチドであって、二官能性または多官能性であるポリペプチド。

5. 請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記SCRがヒト起源であり、また血清中に存在するか若しくは細胞表面に表現されるタイプのタンパクであるポリペプチド。

6. 請求項1～5の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記TBRが、グリコホリンもしくは他の赤血球細胞表面タンパク、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ、

ウイルス抗原、抗体もしくは他のIgGファミリーのメンバー、腫瘍増殖因子 α (TGF- α)、腫瘍マーカー、細胞表面タンパクおよび白血病阻害因子 (LIF) からなる群から選択される標的に結合することができるポリペプチド。

7. 請求項1～6の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドであって、

修飾抗体もしくは抗体フラグメント、s c F vフラグメント、修飾CD8分子、および抗体分子もしくはそのフラグメントとCD8との組合せを含む、免疫グロブリンスーパーファミリーに対して相同性を有するポリペプチド。

8. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物。

9. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を製造する方法であって、標的結合性ポリペプチドコードするDNAを、突然変異および選別の一以上のサイクルに供して、改変された親和性、特異性または結合活性の特性をもった標的結合性ポリペプチドをコードするDNAのサブポピュレーションを得ることを具備した方法。

10. 請求項9に記載の方法であって、標的結合性ポリペプチドをコードする前記DNAが、複製の能力のある要素または表現ベクター内に存在する方法。

11. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターが、バクテリオファージ、繊維状バクテリオファージ、ウイルス、バクテリア、酵母、粘菌、または哺乳類細胞からな

る群から選択される方法。

12. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターがpHFAである方法。

13. 請求項12に記載の方法であって、突然変異が大腸菌の突然変異株を用いて行なわれる方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドを製造する方法であって、

a) 一以上の所望の標的結合性ポリペプチドのフレームワーク構造をコードするDNAを、ポリメラーゼチェーン反応によって単離する工程と、

b) 該DNAを一以上の表現ベクターに挿入する工程と、

c) 所望の特異性、結合活性または親和性の標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを選別することと、

d) 改変された親和性、特異性または結合活性の特性を有する標的結合性ポリ

ペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを得るために、前記該選別されたサブポピュレーションを、突然変異誘発および選別の一以上のサイクルに供する工程と、

e) 改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、高レベル発現ベクターに挿入する工程と、

f) 上記の高レベル発現ベクターを適切な発現宿主中に導入する工程と、

g) 前記標的結合性タンパクを発現させる工程と、

h) こうして産生されたタンパクを単離する工程とを具備

した方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、薬学的に許容され得る担体とを含有する薬剤組成物。

15. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、希釈剤とを含有する診断試薬。

16. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの診断における使用。

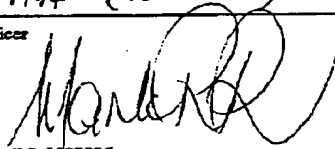
17. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの医薬としての使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU 93/00491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁵ C07K 15/12; C12P 21/08; C12N 15/10; C12N 15/11; C12N 15/12; C12N 15/13 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K 15/12; C07K 15/00; C07K 15/28; C07K 13/00; C12P 21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) File WPAT: Keywords: Influenza virus neurominidase; transforming growth factor alpha; leukaemia inhibitory factor; CD8 File CASA: Keywords: as above		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X, Y	Lehninger, Albert L., Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, 1982. Sec Chapter 30, pp. 926-933.	1, 2, 8, 9, 14-17
X, Y	Erllich, Henry A. (Ed), PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York, 1989. Sec Part 1, pp. 1-5	14
X	AU, A, 21383/88 (Baylor College of Medicine) 25 January 1990 (25.01.90)	6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January 1994 (10.01.94)		Date of mailing of the international search report 13 JAN 1994 (13.01.94)
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No. (06) 2853929		Authorized officer M. ROSS  Telephone No. (06) 2832295

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU 93/00491

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X,Y	Callow, Kathleen A., Measurement of Antibodies to Influenza Virus Neurominidase by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Infect. Immun. 41(2) pp. 650-6, 1983	6
X,Y	Chemical Abstracts, Vol. 113, No. 1, issued 1990 (Columbus, Ohio) Sorvillo, John, et al, Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for human transforming growth factor alpha, see the abstract no. 4322f. Oncogene, 5,(3), pp. 377-86, 1990	6
X,Y	AU,A,91229/91 (Immunex Corporation) 8 July 1992 (08.07.92)	1,2,5,6,8,14-17
X,Y	AU,A,79001/91 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.) 27 November 1991 (27.11.91)	1-6,8-11,14-17
X	AU,B,36143/84 (596070) (The Wistar Institute) 27 June 1985 (27.06.85)	1-6,7,8-11,14-17
X	EP 239400 (Gregory Paul Winter) 30 September 1987 (30.09.87)	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family memb

International application No.
PCT/AU93/00491

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
AU	91229/91	CA	20972/91	EP	561960	FI	932477
		NO	931955	WO	92/10570		
AU	79001/91	BR	9106392	EP	528951	FI	924818
		GB	9009549	HU	9203371	WO	91/16927
AU	36143/84	DE	3479289	DK	3102/85	EP	141783
		EP	291636	US	473123	US	5053224
EP	239400	GB	8607679	GB	8707252	GB	2188638
		JP	62296890	US	5225339		
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I
C 0 7 K	16/10		
	16/18		
	16/28		
	16/30		
	19/00	8318-4H	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, H U, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN		
(72)発明者	ラー、マリア オーストラリア国、ビクトリア州 3071、 ソーンベリー、クラレンドン・ストリート 33		
(72)発明者	コート、アレックス・アンドリュウ オーストラリア国、ビクトリア州 3041、 ストレイスマア、アップランド・ロード 23		
(72)発明者	アービング、ロバート・アレキサンダー オーストラリア国、ビクトリア州 3170、 マルグレイブ、ハニー サックル・アベニ ュー 1		
(72)発明者	アトウエル、ジョン・レスリー オーストラリア国、ビクトリア州 3133、 ベルモント・サウス、グレンウエリー・コ ート 7		
(72)発明者	マルビー、ロビン・ルイーズ オーストラリア国、ビクトリア州 3056、 ブランズウィック、パークリー・ストリー ト 5、ユニット 7		
(72)発明者	パワー、バーバラ・エレイン オーストラリア国、ビクトリア州 3111、 ドンペール、キャベナ・ストリート 6		
(72)発明者	コルマン、ピーター・マルコム オーストラリア国、ビクトリア州 3122、 ホーソーン、ホーソーン・グレン 30エー		